

## TESTE DE LIGAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE À MEMBRANA PERIVITELINA DA GEMA DE OVO APÓS ADIÇÃO DE RINGER LACTATO, CITRATO DE SÓDIO 2,92 % E SOLUÇÃO TRIS NO SÊMEN CAPRINO DESCONGELADO

[Sperm-perivitelline membrane egg binding assay after addition of Ringer Lactate, Sodium Citrate 2.92 % and TRIS Solution in thawed goat semen]

Julio Cesar Oliveira Dias<sup>1\*</sup>, Madriano Christilis da Rocha Santos<sup>1</sup>, Jurandy Mauro Penitente Filho<sup>1</sup>, Giselle Dias Oliveira<sup>2</sup>, Vivian Rachel Araújo Mendes<sup>2</sup>, Antonio Bento Mancio<sup>3</sup>.

1- Médico Veterinário e Doutorando em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa (UFV)

2- Médica Veterinária e Mestranda em Medicina Veterinária – UFV

3- Professor Adjunto Curso de Zootecnia- UFV

**RESUMO** - Com o presente estudo se verificou através do Teste de Ligação dos Espermatozoides à Membrana Perivitelina da Gema de Ovo a capacidade fecundante dessas células após o descongelamento e adição das soluções Ringer com Lactato, Citrato de Sódio 2,92% e TRIS. O sêmen dos animais foi coletado e realizado os procedimentos padrões de análise e criopreservação seminal. Após o descongelamento foi adicionado os diluentes Ringer com Lactato, Citrato de Sódio 2,92 % e Solução TRIS, os quais continham substâncias protetoras aos espermatozoides. Logo após, foram realizados os Testes de Ligação do Espermatozoide à Membrana Perivitelina da Gema de Ovo e Morfológico. Os parâmetros seminais do sêmen fresco ficaram de acordo com preconizado pela legislação vigente (CBRA,1998). A capacidade de ligação dos espermatozoides à membrana perivitelina da gema do ovo foi semelhante entre os tratamentos ( $P>0,05$ ), mas foi observada correlação positiva entre a motilidade espermática e a capacidade de ligação ( $P<0,05$ ). A diluição do sêmen criopreservado com soluções isoosmóticas após o descongelamento pode ser útil na manutenção da qualidade espermática e no aumento do volume existente a fim de otimizar a realização de testes e biotecnologias reprodutivas *in vitro*.

**Palavras-chave:** bode, diluente, espermatozoide.

**ABSTRACT** - The present study was verified by testing for binding of sperm to the perivitelline membrane of the egg yolk fertilizing capacity of these cells after thawing and addition of Ringer Lactate, Sodium Citrate 2.92% and TRIS Solution. The semen of animals was collected and performed the standard procedures of analysis and cryopreservation seminal. After thawing was added the solutions Ringer Lactate, Sodium Citrate 2.92% and TRIS, which contained protective substances to sperm and performed the tests *in vitro* Sperm-Perivitelline Membrane Egg Binding and Morphology. The seminal parameters of fresh semen were recommended according to current legislation. The binding capacity of the sperm membrane perivitelline egg yolk was similar between treatments ( $P>0,05$ ), but there was a positive correlation between sperm motility and binding capacity ( $P<0,05$ ). Thus, the dilution of semen cryopreserved with solutions isoosmóticas after thawing can be useful in maintaining the quality of sperm and increase existing volume to optimize the testing and reproductive biotechnologies *in vitro*.

**Keywords:** goat, extender, spermatozoa.

### INTRODUÇÃO

A inexistência de técnicas rápidas, eficazes e seguras para se avaliar a capacidade fecundante da célula espermática caprina, antes e após o processo de congelamento, representa um dos grandes desafios para se avaliar a eficiência das

biotecnologias utilizadas na reprodução animal (Luz *et al.*, 2000), como a Inseminação Artificial (IA), Produção de Embriões *in Vitro* (PIV) e Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI).

---

\*Autor para correspondência: E-mail: diasjuliovet@yahoo.com.br

Teste de Ligação do Espermatozoide à Membrana Perivitelina da Gema de Ovo permite verificar a capacidade fecundante da célula espermática, e assim, é considerado um valioso teste na análise da eficácia do processo de criopreservação do sêmen (Barbato *et al.*, 1998).

Também avalia indiretamente os eventos bioquímicos relacionados à fertilização (capacitação e reação acrossômica), os quais possuem mensurações mais complexas (Amorim, 2008). Dessa a isso, esse teste já foi estudado em muitas espécies domésticas: suínos (Pinho *et al.*, 2012), equinos (Fazelli *et al.*, 1993a), bovinos (Fazelli *et al.*, 1993b) e caprinos (Santos, 2010).

Todas as biotecnologias reprodutivas, e principalmente, o processo de criopreservação acarretam alterações na morfologia e, ou, fisiologia dos espermatozoides. Assim, os diluentes utilizados na preservação seminal contêm substâncias que protegem as membranas das células espermáticas dos efeitos danosos das mudanças térmicas durante as fases de resfriamento e congelamento do sêmen (Holt, 2000; Silva & Guerra, 2011).

Dentre os diluentes mais utilizados, estão aqueles à base de TRIS, os quais possuem efeito tampão no meio extracelular, minimizam as variações intracelulares de pH e possuem carboidratos que podem ser utilizados como fonte de energia ou como crioprotetores extracelulares (Salamon & Maxwell, 2000; Salviano & Souza, 2008).

Outros diluentes como o Citrato de Sódio 2,92% e a solução fisiológica Ringer lactato são isoosmóticas e podem ser utilizadas como extensores ou expansores seminais (Aisen, 2008; Salviano & Souza, 2008). Essas soluções são utilizadas na rotina dos Laboratórios de Reprodução Animal como meio de lavagem dos espermatozoides após a centrifugação, ou então como pré-diluidores para análises microscópicas do sêmen (motilidade e vigor espermático) (Dell'aqua Junior & Papa, 2001).

A importância da correta utilização dos crioprotetores na conservação espermática pode ser verificada nos testes *in vivo* e *in vitro* realizados após o descongelamento. Muitos metabólitos tóxicos, como íon hidrogênio, radicais livres e ácido lático, são produzidos no retorno do metabolismo dos espermatozoides pós-descongelamento. Também é possível se observar, alterações na osmolaridade e choque osmótico das células espermáticas, além de intoxicação por alguns crioprotetores como o glicerol (Holt, 2000).

Essas alterações no meio intra e extracelular do espermatozoide podem ocasionar a lise da sua

membrana celular (morte), alteração do seu metabolismo (Graham, 1996; Holt, 2000), e assim, diminuição da sua capacidade fecundante. A adição de soluções isoosmóticas tamponantes ao sêmen descongelado poderia melhorar a manutenção da osmolaridade e pH, diminuir a produção de radicais livres e neutralizar substâncias tóxicas. Assim, o objetivo com este trabalho foi verificar através do teste de ligação do espermatozoide à membrana perivitelina da gema do ovo a capacidade fecundante dos espermatozoides caprinos após o descongelamento e adição das soluções Ringer com Lactato, Citrato de Sódio 2,92% e TRIS.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Setor de Caprinocultura e no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Viçosa. Foram selecionados dois reprodutores caprinos adultos, com média de quatro anos de idade, mantidos em baias individuais, clinicamente sadios e com histórico de fertilidade normal. Antes do período experimental, os animais foram submetidos a exame andrológico de acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Os animais receberam alimentação volumosa composta de silagem de milho e concentrado proteico, bem como sal mineral e água *ad libitum*, atendendo às exigências nutricionais da categoria.

O sêmen dos animais foi coletado com intervalo de um dia, no período da manhã, durante o mês de março de 2010. Foram coletados oito ejaculados por animal, utilizando a técnica da vagina artificial de modelo curto (Mies Filho, 1982) aquecida com água a 40-42 °C, e como manequins, fêmeas que estavam na fase de estro.

As análises físicas do sêmen, como volume (mL), aspecto (aquoso, leitoso e cremoso), coloração (branca, branca-amarelada e amarelada), turbilhonamento (0-5), motilidade individual progressiva (MIP, 0-100%), vigor espermático (VIG, 0-5), concentração espermática (espermatozoides/mL), morfologia espermática (% defeitos maiores e menores) foram realizadas de acordo com Santos et al. (2006). As amostras seminais foram diluídas para uma concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides por mL com o diluente Glicose-EDTA gema de ovo (BISPO, 2011) e envasados em palhetas de 0,25 mL de polietileno. Essas foram encaminhadas para uma geladeira permanecendo na posição horizontal a 5°C, por uma hora. Em seguida, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio (-120 °C), na posição vertical, por 15 minutos, e, posteriormente,

as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Após 30 dias de realizado o processo de criopreservação, as palhetas foram descongeladas a 37 °C, por 30 segundos, e os conteúdos transferidos para tubos de polietileno que continham 0,25 mL dos diluentes Ringer Lactato (Equiplex®), ou Citrato de Sódio 2,92 % ou Solução TRIS (Aisen & Venturino, 2008). Todas as partidas de sêmen descongeladas foram misturadas aos três diluentes testados, seguido de incubação a 37 °C por um período de 5 minutos. Nos tubos de polietileno dos grupos controles não foi adicionado nenhum outro material além do sêmen descongelado.

A MIP, VIG e morfologia espermáticos foram avaliados de acordo com Santos *et al.* (2006) após 5 minutos de incubação.

A membrana perivitelina foi preparada separando a gema da clara do ovo e retirando o excesso de clara com um papel-filtro. A gema foi colocada sobre Parafilm® e sua membrana delicadamente rompida e lavada com Bull TALP medium® (B-TALP). Posteriormente, a membrana foi colocada em uma placa de Petri e lavada várias vezes com B-TALP até que a solução estivesse limpa. Em seguida, utilizando uma cubeta de espectrofotômetro como molde, a membrana foi cortada em pequenos quadrados (1 cm<sup>2</sup>), sendo cada pedaço transferido para um tubo de cultura (10 mL) contendo 1 mL de B-TALP.

Após terem transcorrido os cinco minutos do descongelamento das palhetas de sêmen nos tubos de polietileno que continham as soluções isoosmóticas, foi retirada uma alíquota de 20 µL, com concentração de  $6,25 \times 10^6$  espermatozoides por mL, e transferida para os tubos de cultura que continham a membrana.

As membranas com os espermatozoides foram incubadas por uma hora a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Depois de transcorridos os primeiros 30 minutos de incubação, os tubos foram agitados suavemente e acrescentou-se 3 µL do corante acetato de orceína (Orcein Synthetic, Sigma®, EUA) para corar os espermatozoides. Finalizado a fase de incubação, as membranas foram colocadas em um tubo de cultura e lavadas cinco vezes com solução B-TALP (1 mL) para a retirada dos espermatozoides que não se aderiram.

Após o término da incubação as membranas foram delicadamente espalhadas sobre lâminas para serem removidas possíveis dobras, cobertas com lamínulas e examinadas em microscópio óptico

com contraste de fase, em objetiva de 40x. Foram contados todos os espermatozoides aderidos à membrana em seis microcampos escolhidos aleatoriamente, estimando, assim, o percentual segundo Barbatto *et al.* (1998).

As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade (teste de Lilliefors) e homocedasticidade (teste de Cochran & Bartlett) e, posteriormente, à análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste de Tukey a 5 % de probabilidade. A determinação das relações entre as características estudadas foi feita pelo teste de correlação de Pearson, e o programa utilizado para análises estatísticas foi o SAEG, versão 9.1 (UFV, 2007). Para as análises dos parâmetros seminais (volume, aspecto, coloração, concentração e turbilhonamento) foram utilizadas a estatística descritiva.

Este projeto de pesquisa foi registrado junto a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa, em 01/07/2010, sob o protocolo 50453459502.

## RESULTADOS

No sêmen fresco, foram encontradas as médias de  $1,03 \pm 0,04$  para o volume seminal (mL),  $3,33 \pm 0,2 \times 10^9$  espermatozoides/mL para a concentração espermática e  $3,22 \pm 0,07$  para o turbilhonamento (0-5). Foi observada maior percentagem do aspecto leitoso (87,5 %), seguido de cremoso (12,5 %) e ausência do aspecto aquoso. A coloração branca-amarelada foi a mais observada (68,8 %), seguida da coloração amarelada (31,2 %), enquanto a coloração branca não foi encontrada no sêmen fresco.

As porcentagens de espermatozoides aderidos à membrana foram 0,20; 0,19; 0,13 e 0,16% para os tratamentos Controle, Solução TRIS, Ringer Lactato e Citrato de Sódio, respectivamente. Conforme observado na tabela 1, não foi encontrada influência dos tratamentos ( $P > 0,05$ ) no teste de ligação do espermatozoide caprino à membrana perivitelínica da gema de ovo, assim como nas patologias espermáticas (defeitos maiores e menores). No entanto os parâmetros MIP e VIG aos cinco minutos após o descongelamento apresentaram diferenças entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1).

Foram encontradas correlações positivas ( $P < 0,05$ ) entre a motilidade e vigor espermático com o Teste de Ligação dos Espermatozoides Caprinos à Membrana Perivitelina (Tabela 2).

**Tabela 1:** Motilidade individual progressiva (MIP-%) e vigor espermático (VIG – 0 a 5) aos 5 minutos, Testes de Ligação\* e Morfológico do sêmen descongelado, entre os tratamentos.

Tratamentos	MIP	VIG	Teste de Ligação	Morfologia	
				Defeitos Maiores	Defeitos Menores
Grupo controle	42,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	253,3 ± 156,2 <sup>a</sup>	5,32 ± 3,48 <sup>a</sup>	6,33 ± 3,66 <sup>a</sup>
Solução TRIS	32,8 ± 1,4 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	236,5 ± 164,2 <sup>a</sup>	6,00 ± 4,08 <sup>a</sup>	9,47 ± 5,41 <sup>a</sup>
Ringer Lactato	30,9 ± 1,5 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	165,0 ± 165,2 <sup>a</sup>	5,84 ± 3,28 <sup>a</sup>	7,24 ± 7,15 <sup>a</sup>
Citrato de Sódio 2,92%	26,3 ± 2,4 <sup>c</sup>	2,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	205,1 ± 132,5 <sup>a</sup>	5,68 ± 3,98 <sup>a</sup>	4,77 ± 7,45 <sup>a</sup>

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste de Tukey;

\*números de espermatozoides contados nos 6 campos.

**Tabela 2:** Correlações de Pearson (r<sup>2</sup>) entre motilidade (MOT) e vigor espermático (VIG) do sêmen descongelado com o Teste de Ligação dos Espermatozoides caprinos à membrana perivitelina e com a Morfologia Espermática.

Parâmetros	r <sup>2</sup>
MOT vs Teste de ligação dos espermatozoides com à membrana perivitelina da gema do ovo	+ 0,30
VIG vs Teste de ligação dos espermatozoides com à membrana perivitelina da gema do ovo	+ 0,38

Significativo (P<0,05)

## DISCUSSÃO

O volume seminal encontrado neste trabalho se encontra no intervalo esperado de 0,2 a 2 mL (Rovay, 2006; Santos *et al.*, 2006), e também, dentro do recomendado pelo CBRA (1998) que é de no mínimo 0,8 mL. A coloração e aspecto se apresentaram de acordo com o descrito por Ax (2004). Nos caprinos, o sêmen é naturalmente mais amarelado (Ax, 2004) e, na maioria das vezes, é devido à presença de plasma seminal em grande quantidade. Segundo os autores Chemineau *et al.* (1991) e Ax (2004), o aspecto e a coloração dos sêmen de ruminantes pode ser um indicador da concentração de espermatozoides. Assim, quanto menos aquoso e mais branco (menos plasma), maior será a concentração de espermatozoides no sêmen.

A concentração média do ejaculado de 3,33 ± 0,2 (x10<sup>9</sup>/mL) foi de acordo com Santos *et al.* (2006) e Castelo *et al.* (2008), que encontraram para a espécie caprina uma média 3,0 bilhões/mL, e ainda está acima do recomendado pelo CBRA (1998) que é de 2,0 bilhões/mL.

A morfologia espermática do sêmen fresco foi resumida em defeitos maiores e menores (Tabela 1), sendo que os defeitos menores apresentaram-se em maior percentagem que os defeitos maiores, com exceção do tratamento que recebeu a solução de Citrato de Sódio. No entanto, pode-se notar que a anormalidade total foi baixa, como estabelecido pelo CBRA (1998) (menos de 30%).

De acordo com os resultados encontrados, as percentagens de espermatozoides aderidos à

membrana em todos os tratamentos foram semelhantes aos encontrados por Pinho *et al.* (2012) que utilizaram sêmen suíno também congelado em dois diferentes meios de incubação (B-TALP e BTS). As células espermáticas que não passaram pelo processo de congelamento podem apresentar maiores índices de adesão a membrana perivitelina, como observado por Reis *et al.* (2003) e Csermak Junior (2011) que trabalharam, respectivamente, com sêmen suíno resfriado e sêmen canino fresco, e encontraram percentagens maiores de adesão do que com os sêmens congelados. Segundo Barbato *et al.* (1998), o menor percentual de espermatozoides ligados quando se usa sêmen congelado, deve-se aos danos causados às células espermáticas durante o processo de criopreservação.

Como observado na Tabela 1, apesar de ter sido encontrada diferença (P<0,05) nos parâmetros motilidade e vigor após 5 minutos de descongelamento, a capacidade de ligação à membrana perivitelínica da gema do ovo foi semelhante entre os tratamentos. Assim, percebe-se que as soluções isoosmóticas adicionadas permitiram o mesmo potencial de ligação, e dessa forma, possivelmente a mesma capacidade fecundante.

Apesar de estatisticamente serem iguais, o grupo controle foi o que apresentou maior número de espermatozoides ligados à membrana perivitelina dentre os tratamentos utilizados. Esse fato pode ter ocorrido devido à diluição (1:1) realizada nos tratamentos que receberam as soluções isoosmóticas após o descongelamento das palthetas

contendo o sêmen. Uma diluição excessiva pode ter modificado a osmolaridade do meio, e assim, alterado a fisiologia espermática.

Dentre os tratamentos utilizados, a solução TRIS foi a que apresentou maior número de espermatozoides ligados à membrana perivitelina. Uma explicação para esse melhor resultado pode ser a presença da frutose em sua composição, que é utilizada pelos espermatozoides como substrato energético, e assim, pode aumentar a sobrevivência e metabolismo das células espermáticas (Gonzales *et al.*, 1984). Também estão presentes nesta solução o ácido cítrico e o TRIS (Tris-hidroximetilaminometano), os quais têm ação tamponante e realizam a manutenção do equilíbrio osmótico do meio (Salviano *et al.* 2008). Assim, dentre as soluções utilizadas neste trabalho, a solução TRIS é aquela que melhor poderia ser utilizada na expansão das doses seminais para as biotecnologias reprodutivas, como a Fertilização *in vitro* (FIV) e Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), em situações que o sêmen a ser utilizado é de alto custo ou está em menor quantidade.

Por outro lado, a solução Ringer Lactato, que apresenta em sua composição somente sais como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$ , demonstrou o menor número de espermatozoides ligados à membrana perivitelina. Portanto, a ausência de um substrato energético e tamponante no meio diluente pós-descongelamento, como o citrato presente nas soluções TRIS e Citrato de Sódio 2,92%, pode ter ocasionado alterações na morfologia e, ou, metabolismo espermático.

A interação do espermatozoide com membrana perivitelina (zona pelúcida em mamíferos) e a penetração no ooplasma mostram-se intimamente associadas à motilidade espermática (HAY *et al.*, 1997). Neste trabalho, as correlações encontradas foram positivas para motilidade e vigor com o Teste de Ligação dos Espermatozoides na Membrana Perivitelina da Gema do Ovo (Tabela 2), ou seja, quanto maior a movimentação e a força do movimento, maior seria a capacidade de ligação e fecundação dos espermatozoides. Segundo o CBRA (1998), as avaliações de motilidade e vigor espermático são subjetivas, e, portanto, sujeitas a variações na dependência do treinamento técnico. No entanto, o teste de ligação é considerado um teste objetivo uma vez que a sua metodologia se baseia na contagem direta de todas as células espermáticas observadas através de microscopia. Assim, o teste de ligação poderia ser utilizado como exame complementar na avaliação seminal em trabalhos científicos e centrais de coleta de sêmen.

## CONCLUSÃO

Dessa forma, não houve alteração na capacidade fecundante dos espermatozoides caprinos após o congelamento e diluição com as soluções, no entanto elas poderiam ser utilizadas na expansão de doses seminais que se encontram em menores quantidades, aumentando o volume para testes e análises *in vitro* dos espermatozoides. Poderiam também possibilitar a expansão de doses seminais utilizadas em biotecnologias reprodutivas *in vitro*.

## AGRADECIMENTOS

Ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa, e à Universidade Federal de Viçosa pelo apoio estrutural.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aisen E.G. & Venturino A. 2008. Coleta e avaliação do sêmen, p. 57-73. In: AISEN E.G. (ed.) Reprodução Ovina e Caprina. 1ª ed. Editora MedVet, São Paulo.
- Amorim E.A.M. 2008. Membrane alteration of boar, bulls and stallions in the quality of semen. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 174p.
- Ax R.L., Dally M., Didion B.A., Lenz R.W., Love C.C., Varner D.D., Hafez B. & Bellin M.E. 2004. Avaliação do sêmen. In: HAFEZ B. e HAFEZ E.S.E. (ed.), Reprodução Animal. 7ª ed. Editora Manole, Barueri.
- Barbato G.F., Cramer P.G. & Hammerstedt R.H. 1998. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biology of Reproduction*. 58: 686-699.
- Bispo C.A.S., Pugliesi G., Galvão, P., Rodrigues M.T., Ker P.G. & Filgueiras B. 2011. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 100:54– 58.
- Castelo T.S., Frota T.R. & Silva A.R. 2008. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*. 2(3):67-75.
- Chemineau P., Cagnié Y., Guérin Y., Orgeur P. & Vallet J.C. 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), FAO Animal Production and Health Paper, 222p.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ª ed. CBRA, Belo Horizonte.
- Csermak Junior A.C. 2011. Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozoide do cão (*Canis lupus familiaris*) à membrana perivitelina do ovo de galinha (*Gallus gallus*) como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 83p.
- Dell'aqua Junior J.A. & Papa F.O. 2001. Efeito de diluentes e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelamento de sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 25:460-462.

Fazzelli A.R., Steenweg W., Bevers M.M., Bracher V., Parlevliet J. & Colenbrander B. 1993a. Use of sperm binding to homologous hemozona pellucid to predict stallion fertility. *Equine Veterinary Journal Supplement*. 15: 57-59.

Fazzelli A.R., Steenweg W., Bevers M.M., De Loos F.A.M., Van Den Broek J & Colenbrander B. 1993b. Development of a sperm zona pellucid binding assay for bull semen. *The Veterinary Record*. 132: 14-16.

Gonzales C.I.M., Neves J.P., Silva C.A.M. 1984. Determinação do sódio, potássio, cálcio e magnésio no OS ovino em diferentes tempos de incubação do sêmen a +37 °C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 8(3): 174-178, 1984.

Graham J.K. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 12: 131-147.

Hay M.A., King W.A., Gartley C.J., Leibo S.P. & Goodrowe K.L. 1997. Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*. 48: 1329-1342.

Holt W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 3-22.

Luz S.L.N., Neves J.P. & Gonçalves P.B.D. 2000. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*. 37(2): 10-18.

Mies Filho A. 1982. Inseminação artificial. 5ª ed. Editora Sulina, Porto Alegre.

Pinho R.O., Shiomi H.H., Lima D.M.A., Costa E.V., Santos M.C.R., Lopes P.S., Guimarães S.E.F., Guimarães J.D. 2012. Teste de ligação de espermatozoides de suínos da raça Piau à membrana perivitelina da gema do ovo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 36(4): 245-249.

Reis G.R., Bernardi M.L., Wentz I., Bortolozzo F.P., Weitze K.F., Amann R., Kellers C., Zemmrich J. 2003. Fertilidade de sêmen suíno avaliada pelo teste de ligação dos espermatozoides a um substrato sintético. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 1343-1349, 2003.

Rovay H. 2006. Efeitos de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos. *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa*. 56p.

Salamon S. & Maxwell W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 77-111.

Salviano M.B. & Souza J.A.T. 2008. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 32(3): 159-167.

Santos A.D.F., Torres C.A.A., Fonseca J.F., Borges A.M., Guimaraes J.D., Costa E.P. & Rovay H. 2006. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 35(5): 1934-1942.

Santos, M.C.R. 2010. Métodos alternativos para análises da capacidade de ligação dos espermatozoides caprinos. *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa*. 54p.

Silva S.V. & Guerra M.M.P. 2011. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35(4): 370-384.

Universidade Federal De Viçosa – UFV. SAEG – Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas. Versão 9.1. Viçosa, MG: 2007.