

CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN CAPRINO DESCONGELADO APÓS A ADIÇÃO DE RINGER LACTATO, CITRATO DE SÓDIO E SOLUÇÃO TRIS

CHARACTERISTICS OF THAWED GOAT SEMEN AFTER ADDITION OF RINGER LACTATE, SODIUM CITRATE AND TRIS SOLUTION

Júlio Cesar Oliveira Dias¹
Madriano Christilis da Rocha Santos²
Jurandy Mauro Penitente Filho²
Gisele Dias Oliveira³
Vivian Rachel Araujo Mendes³
Antonio Bento Mancio⁴

¹ Médico Veterinário, Doutor, Viçosa, MG, Brasil - diasjuliovet@yahoo.com.br

² Médicos Veterinários, Doutores, Viçosa, MG, Brasil.

³ Médicas Veterinárias, Mestres, Viçosa, MG, Brasil.

⁴ Professor Doutor Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

Resumo

A criopreservação do sêmen é de grande importância para diversas biotecnologias da reprodução, como Inseminação Artificial (IA), Produção de Embriões In Vitro (PIV) e Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI). Avaliou-se a estabilidade e persistência da motilidade e vigor dos espermatozoides, assim como alterações da membrana plasmática, após a adição de Ringer com Lactato, citrato de sódio 2,92% ou solução TRIS ao sêmen caprino descongelado. O sêmen foi coletado de dois bodes da raça Parda Alpina, realizando-se os procedimentos padrões de análise e criopreservação seminal. Após a descongelação do sêmen, foram adicionados os diluentes Ringer Lactato, citrato de sódio 2,92% ou solução TRIS, realizando-se os Testes de Termorresistência (TTR), Supravital e Morfológico. No TTR, somente o grupo a que foi adicionada a Solução TRIS obteve motilidade e vigor por maior período (90 minutos; $P < 0,05$). Não foi encontrada influência da adição das soluções na análise morfológica, assim como no teste Supravital, o qual apresentou valores próximos aos encontrados para motilidade ($P > 0,05$). Concluiu-se que a adição das soluções não permite uma grande persistência da motilidade e vigor dos espermatozoides descongelados, porém a solução TRIS poderia ser utilizada para expansão de doses seminais utilizadas em biotecnologias reprodutivas *in vitro*.

Palavras-chave: bode; diluente; espermatozoide; sêmen.

Abstract

Cryopreservation of semen is of great importance for various reproductive biotechnologies such as artificial insemination (IA), In Vitro Embryo Production (PIV) and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). The objective of this work was to evaluate the stability and persistence of motility

and strength of sperm, as well as changes in the plasma membrane after the addition of Ringer Lactate, sodium citrate 2.92% or TRIS solution in thawed goat semen. Semen was collected from two Alpine Brown goats, and standard procedures for cryopreservation and seminal analysis were performed. After thawing the semen, the extenders Ringer Lactate, sodium citrate 2.92% and TRIS solution were added and Thermoresistance (TTR), Supravital and Morphology Tests were carried out. In TTR, only the group received TRIS solution presented motility and strength for a longer period (90 minutes; $P < 0,05$). No influence of the addition of the solutions was found in the morphological analysis, as well as in the Supravital Test, which showed values close to those found for motility ($P > 0,05$). We concluded that the addition of the solutions does not allow a large persistence of motility and strength of thawed sperm, but TRIS solution could be used for expansion of seminal doses used in vitro reproductive biotechnology.

Keywords: extender; goat; semen; spermatozoa.

Recebido em: 17 maio 2013.

Aceito em: 26 janeiro 2015

Introdução

O TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano- $H_2NC(CH_2OH)_3$) é o principal componente dos diluentes de sêmen caprino utilizados rotineiramente⁽¹⁾. Essa substância tem maior poder tampão que o fosfato e o citrato, além de poder ultrapassar a membrana plasmática e minimizar as variações intracelulares de pH^(2,3).

A solução de citrato de sódio 2,92% e a solução fisiológica Ringer Lactato são isoosmóticas e podem ser utilizadas como extensores do sêmen^(3,4). Geralmente, essas soluções são utilizadas para uma pré-diluição do ejaculado e avaliação da motilidade e vigor, ou ainda como tampão de lavagem do sêmen centrifugado⁽⁵⁾.

O retorno do metabolismo dos espermatozoides após a descongelação leva à síntese de grandes quantidades de metabólitos tóxicos, acarretando aumento da concentração de íons hidrogênio, radicais livres e ácido lático no meio extracelular, diminuindo drasticamente o pH do meio. Pode ocorrer ainda alteração da osmolaridade levando as células espermáticas a um choque osmótico e também à intoxicação pelo glicerol utilizado na criopreservação⁽⁶⁾. Dessa forma, essas alterações no meio podem acarretar a lise das membranas celulares e alteração no metabolismo com, conseqüentemente, morte das células espermáticas^(6,7).

A diluição do sêmen após a descongelação com soluções iso-osmóticas tamponantes poderia permitir a manutenção da osmolaridade e pH, diminuir a produção de radicais livres, neutralizar substâncias tóxicas e expandir doses seminais possíveis de serem utilizadas em biotecnologias reprodutivas *in vitro*, como a Fertilização *in vitro* (FIV) e Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a estabilidade e persistência da motilidade e vigor dos espermatozoides, assim como alterações da membrana plasmática, após adição de Ringer Lactato, citrato de sódio 2,92% e solução TRIS ao sêmen caprino descongelado.

Material e Métodos

Este experimento foi conduzido no Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se dois reprodutores caprinos adultos da raça Parda Alpina, com idade média de quatro anos. Os animais eram mantidos em baias individuais, recebendo alimentação volumosa composta de silagem de milho e concentrado proteico, bem como sal mineral e água *ad libitum*, atendendo às exigências nutricionais da categoria. Os animais foram submetidos às avaliações clínicas e andrológicas conforme Bispo et al.⁽⁸⁾.

As coletas foram realizadas durante a estação reprodutiva (entre março e abril) utilizando-se uma vagina artificial de modelo curto aquecida com água a 40-42 °C. No total, foram realizadas oito coletas em cada um dos dois animais, sendo duas por semana (terça e quinta-feira), no período da manhã, durante quatro semanas, perfazendo 16 ejaculados analisados. O sêmen não passou por processos de lavagens e, após a coleta, foram analisados os seguintes parâmetros⁽⁹⁾: volume (mL), aspecto (aquoso, leitoso e cremoso), coloração (branca, branca-amarelada e amarelada), turbilhonamento (0-5), motilidade individual progressiva (MIP, 0-100%), vigor (0-5), concentração espermática (espermatozoides/mL) e morfologia espermática (% defeitos maiores e menores).

Após a avaliação física do sêmen fresco, as amostras seminais foram diluídas para uma concentração final de 50×10^6 espermatozoides/mL com o diluente Glicose-EDTA gema de ovo^(8, 10). O sêmen diluído foi acondicionado em palhetas de polietileno de 0,25 mL e encaminhado para o resfriamento e congelamento conforme Bittencourt et al.⁽¹¹⁾.

Os meios diluentes TRIS (Tabela 1), Ringer Lactato (Tabela 2) ou citrato de sódio 2,92% (Tabela 3) foram preparados e alíquotados no volume de 0,25 mL cada, em tubos de polipropileno, e transferidos diretamente para o botijão criogênico onde estavam acondicionadas as palhetas com o sêmen.

Um mês após a congelamento, as palhetas de sêmen (0,25 mL) e os tubos de polipropileno com os diluentes (0,25 mL) foram descongelados a 37 °C/30 segundos. O sêmen descongelado foi imediatamente transferido para o tubo de polipropileno perfazendo um volume total de 0,50 mL. Todas as amostras de cada um dos 16 ejaculados foram misturadas aos três diluentes e o grupo controle foi representado somente pelo sêmen descongelado. Assim, foram utilizadas quatro palhetas de cada um dos 16 ejaculados, sendo uma para cada tratamento e controle.

A determinação da viabilidade espermática foi realizada através do teste de termorresistência (TTR), que consiste na incubação do sêmen em banho-maria a 37 °C na tentativa de se reproduzir *in vitro* o que aconteceria com os espermatozoides no interior do trato genital feminino. O TTR foi realizado incubando-se os tubos de polipropileno contendo o sêmen descongelado e as soluções diluentes, em banho-maria, por 3 horas a 37 °C, e analisando-se a motilidade (0-100%) e o vigor (0-5) espermáticos nos tempos de 5, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos⁽⁸⁾. O Teste de Coloração Supravital que analisa indiretamente a integridade da membrana plasmática do espermatozoide foi realizado após os 5 minutos de incubação, adicionando-se 10 µL do corante eosina-nigrosina à 10 µL de sêmen descongelado. Posteriormente, foi realizado um esfregaço em lâmina para leitura em microscópio de luz com aumento de 400 x. Foram contadas 200 células/lâmina e consideradas normais aquelas células que não apresentaram coloração nuclear avermelhada, enquanto que as de núcleo corado foram consideradas lesadas.

Tabela 1: Composição do meio diluente TRIS

Constituintes	Quantidades
Tris (N-Tris [hidroximetil] aminometano)*	2,71 g
Ácido cítrico anido	1,40 g
Frutose	1 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Osmolaridade: 295 mOsm/L; pH: 6,8

* SIGMA-ALDRICH®, EUA.

Fonte: Aisen⁽⁴⁾.

Tabela 2: Composição do meio diluente Ringer com Lactato (Equiplax®)

Constituintes	Quantidades
Lactato de sódio	0,3 g
Cloreto de sódio	0,6 g
Cloreto de potássio	0,03 g
Cloreto de cálcio diidratado	0,02 g
Água q.s.p.	100 mL

Osmolaridade: 274,4 mOsm/L; pH: 6,0-7,5

Fonte: EQUIPLEX® Indústria Farmacêutica.

Tabela 3: Composição do meio diluente citrato de sódio 2,92 %

Constituintes	Quantidades
Citrato de sódio*	2,92 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Osmolaridade: 113 mOsm/L; pH: 3,5

* SIGMA-ALDRICH®, EUA.

Fonte: Aisen⁽⁴⁾.

Para a análise estatística, as variáveis foram submetidas aos testes de normalidade (teste de Lilliefors) e homocedasticidade (tese de Cochram & 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 (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas), versão 9.1⁽¹²⁾. Para as análises dos parâmetros seminais (volume, aspecto, coloração, concentração e turbilhonamento) foi utilizada 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 e Discussão

Os valores médios do volume ($1,03 \pm 0,04$ mL) e da concentração espermática ($3,33 \pm 0,02 \times 10^9$ espermatozoides/mL) do sêmen fresco ficaram dentro dos valores recomendados para a espécie caprina^(9, 13). Os parâmetros aspecto e coloração foram semelhantes aos de Castelo et al.⁽¹³⁾, predominando o aspecto leitoso (87,5 %) e a coloração branco-amarelada (68,8 %). Na espécie caprina, o sêmen se apresenta naturalmente mais amarelado e, segundo Oliveira et al.⁽¹⁴⁾, o aspecto e coloração do sêmen de ruminantes pode ser indicador da concentração de espermatozoides. Assim, quanto menos aquoso e amarelado, menor a quantidade de plasma e maior a concentração de espermatozoides⁽¹³⁾. O parâmetro turbilhonamento espermático apresentou média de $3,22 \pm 0,07$ e porcentagem de defeitos totais do sêmen fresco menor que 30%, resulta semelhante ao encontrado por Bispo et al.⁽⁸⁾.

Os valores para motilidade e vigor do sêmen descongelado no teste de termorresistência (TTR) comparados entre os quatro tratamentos utilizados estão apresentado na Tabela 4. Apesar de o tratamento com solução TRIS ter apresentado menor motilidade ($32,8 \pm 1,4$) após 5 minutos de descongelação em relação ao controle ($42,2 \pm 2,0$) ($P < 0,05$), esse tratamento apresentou maior persistência e diminuição menos abrupta dos parâmetros motilidade e vigor em relação aos outros tratamentos. No entanto, o período de sobrevivência do sêmen em todos os tratamentos não ultrapassou 90 minutos após a descongelação. Santos et al.⁽⁹⁾, utilizando um diluente à base de gema de ovo (Tris-citrato-gema de ovo) na congelação de sêmen caprino, também observaram comportamento semelhante, com queda de motilidade após os primeiros 30 minutos no TTR.

Tabela 4: Motilidade (MIP, %) e vigor (VIG - 0 a 5) no teste de termorresistência (37°C) do sêmen descongelado nos tratamentos experimentais e em função do tempo (minutos)

Tratamentos	5 minutos		30 minutos		60 minutos		90 minutos	
	MIP	VIG	MIP	VIG	MIP	VIG	MIP	VIG
Controle	$42,2 \pm 2,0^a$	$3,3 \pm 0,1^a$	$16,6 \pm 3,0^b$	$1,5 \pm 0,3^b$	$1,3 \pm 1,3^b$	$0,1 \pm 0,1^b$	0 ^b	0 ^b
Tratamento 1	$32,8 \pm 1,4^b$	$3,2 \pm 0,1^a$	$22,2 \pm 2,0^a$	$2,1 \pm 0,2^a$	$10,9 \pm 2,5^a$	$1,0 \pm 0,2^a$	$3,8 \pm 2,00^a$	$0,3 \pm 0,2^a$
Tratamento 2	$30,9 \pm 1,5^b$	$3,1 \pm 0,1^a$	$11,0 \pm 2,2^c$	$1,1 \pm 0,2^b$	$2,7 \pm 1,7^b$	$0,2 \pm 0,1^b$	0 ^b	0 ^b
Tratamento 3	$26,3 \pm 2,4^c$	$2,5 \pm 0,2^b$	$1,9 \pm 1,4^d$	$0,3 \pm 0,2^c$	$0,6 \pm 0,6^b$	$0,1 \pm 0,1^b$	0 ^b	0 ^b

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

Tratamento 1: Solução TRIS; Tratamento 2= Ringer Lactato; Tratamento 3= Citrato de sódio 2,92%.

O melhor desempenho com a utilização da solução TRIS pode ser devido à presença de frutose na sua composição, que é utilizada pelos espermatozoides como substrato energético^(15,16). O ácido cítrico, que é um dos constituintes da solução TRIS, realiza a manutenção do equilíbrio osmótico do meio, assim como o TRIS (hidroximetil)-aminometano que, além da função tamponante, também reduz as variações intracelulares de pH ao ultrapassar a membrana plasmática^(2,3). Assim, os efeitos deletérios causados pelos íons hidrogênio e o ácido láctico, ambos produzidos após a descongelação com reinício do metabolismo dos espermatozoides, podem ser diminuídos com utilização da solução TRIS.

O tratamento em que foi adicionado citrato de sódio 2,92 % foi o que apresentou os menores valores de motilidade e vigor ($P < 0,05$) desde o tempo de cinco minutos. O citrato poder ser utilizado no metabolismo intermediário do espermatozoide e auxiliar no processo de crioproteção favorecendo a entrada mais lenta do glicerol no interior da célula espermática⁽¹⁷⁾. Entretanto,

segundo Al Somai et al.⁽¹⁸⁾, o citrato pode permitir a ativação de proteínas que diminuem a motilidade espermática.

A osmolaridade média do sêmen de equinos obtida por Lagares et al.⁽¹⁹⁾ foi de 284,8 mOsm/L e, segundo Garner e Hafez⁽²⁰⁾, a composição química, inorgânica e bioquímica do sêmen entre os animais domésticos é muito próxima. Portanto, o valor médio da osmolaridade do sêmen caprino deve estar próximo ao encontrado para equinos e, por isso, ao ser adicionada a solução de citrato de sódio 2,92%, os baixos valores de osmolaridade e de pH desta solução podem ter alterado e lesionado as membranas dos espermatozoides. No entanto, Aisen⁽⁴⁾ indica essa solução para avaliação do sêmen de pequenos ruminantes.

Os testes de coloração supravital e morfológico realizados neste trabalho com o sêmen descongelado não apresentaram diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$), conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Motilidade (MOT, %) e vigor (VIG – 0 a 5) aos 5 minutos, e testes supravital (% de células íntegras) e morfológico do sêmen descongelado nos tratamentos experimentais

Tratamentos	MIP (5 min.)	VIG (5 min.)	Supravital	Morfologia (%)	
				Defeitos Maiores	Defeitos Menores
Controle	42,2 ± 2,0 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	38,53 ± 9,33 ^a	5,32 ± 3,48 ^a	6,33 ± 3,66 ^a
Tratamento 1	32,8 ± 1,4 ^b	3,2 ± 0,1 ^a	37,09 ± 8,73 ^a	6,00 ± 4,08 ^a	9,47 ± 5,41 ^a
Tratamento 2	30,9 ± 1,5 ^b	3,1 ± 0,1 ^a	36,00 ± 11,58 ^a	5,84 ± 3,28 ^a	7,24 ± 7,15 ^a
Tratamento 3	26,3 ± 2,4 ^c	2,5 ± 0,2 ^b	33,84 ± 11,88 ^a	5,68 ± 3,98 ^a	4,77 ± 7,45 ^a

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

Tratamento 1: Solução TRIS; Tratamento 2= Ringer Lactato; Tratamento 3= Citrato de sódio 2,92%

Os valores obtidos no Teste Supravital foram próximos aos valores de motilidade espermática no sêmen descongelado (5 min.), como observado por Bispo et al.⁽²¹⁾ ao utilizar o mesmo teste em sêmen caprino. Ainda foram observadas correlações médias positivas da motilidade ($r = +0,39$) e vigor espermático ($r = +0,41$) com o teste supravital ($P < 0,05$). Castilho et al.⁽²²⁾ também encontrou correlação positiva entre motilidade do sêmen caprino descongelado e o teste supravital ($r = +0,71$, $P < 0,05$). Como o teste supravital avalia a integridade de membrana da célula espermática, caso esta tenha sofrido alguma alteração e esteja lesionada, é grande a probabilidade de o espermatozoide estar sem motilidade. Desta forma, comprova-se a acurácia na avaliação da motilidade espermática por meio de microscopia convencional sem auxílio de programas computacionais, podendo considerar o teste como uma ratificação dos valores de motilidade aferidos pelo pesquisador.

Assim como no sêmen fresco, a totalidade de patologias espermáticas no sêmen descongelado em cada tratamento foi baixa, próxima à encontrada por outros autores^(23,24).

Conclusões

A adição das soluções Ringer Lactato, citrato de sódio 2,92% e solução TRIS não permitiu persistência da motilidade e vigor dos espermatozoides após o descongelamento durante o tempo preconizado pelo teste de termorresistência. No entanto, a adição da solução TRIS ao sêmen descongelado permitiu uma diminuição menos abrupta desses parâmetros seminais e, assim, poderia ser utilizada para expansão de doses seminais utilizadas em biotecnologias reprodutivas *in vitro*.

Referências

1. Dorado J, Rodriguez I, Hidalgo M. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*. 2001;68:168-77.
2. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of Ram semen. *Animal Reproduction Science*. 2000;62:77-111.
3. Salviano MB, Souza JAT. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2008;32(3):159-67.
4. Aisen EG. Reprodução ovina e caprina. São Paulo: MedVet; 2008. 243p. Portuguese.
5. Dell'Aqua Junior JA, Papa FO. Efeito de diluentes e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelação de sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2001;25:460-2.
6. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 2000;62:3-22.
7. Graham JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 1996;12:131-47.
8. Bispo CAS, Pugliesi G, Coelho PGB, Rodrigues MT, Ker PG, Filgueiras B et al. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 2011;100:54-8.
9. Santos ADF, Torres CAA, Fonseca JF, Borges AM, Costa EP, Guimarães JD et al. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2006;35(5):1934-42.
10. Martin JC, Klug E, Gunzel A. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal Reproduction and Fertility*. 1979;suppl.27:47-51.
11. Bittencourt RF, Ribeiro Filho AL, Alves SGG, Biscarde CE, Vasconcelos MF, Oba E. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 2006;7(1):27-37.
12. SAEG: Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas [CD-ROM]. Versão 9.1. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2007.
13. Castelo TS, Frota TR, Silva AR. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*. 2008;2(3):67-75.
14. Oliveira IRS, Alves HM, Castelo TS, Bezerra FSB, Bezerra ACDS, Silva AR. Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. *Ciência Animal Brasileira*. 2013;4(2):216-221.
15. Mann T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *Journal Reproduction and Fertility*. 1974;37:179-88.
16. Gonzales CIM, Neves JP, Silva CAM. 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*. 1984;8(3):174-8.
17. Machado R, Simplicio AA. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 1995;19(1-2):61-72.

18. Al-Somai AN, Vishwanath BCR, Shannon B, Mola CP. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull sperm. *Reproduction Fertility Development*. 1994;6:165-71.
19. Lagares MA, Petzoldt R, Sieme H, Klung E. Preservação do sêmen fresco equino: avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*. 1998;26(1):29-42.
20. Garner DL, Hafez ESE. Espermatozoide e plasma seminal. In: Hafez ESE, Hafez B. *Reprodução Animal*. 7nd ed. São Paulo: Manole; 2003. p. 97-110. Portuguese.
21. Bispo CAS, Pugliesi G, Palhão MP, Coelho PGB, Ker PG, Rodrigues MT, et al. Características *in vitro* e fertilidade do sêmen caprino armazenado a 5 °C por 24 horas utilizando duas concentrações de gema de ovo no diluente. *Ciência Animal Brasileira*. 2011;12(4):653-60.
22. Castilho EF, Guimarães JD, Martins LF, Pinho RO, Guimarães SEF, Espeschit CJB. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2009;38(12):2335-45, 2009.
23. Santos EA, Teixeira DIA, Lopes Junior ES. Características seminais, perímetro escrotal e comportamento sexual de bodes Saanen explorados em região litorânea do Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2001;25(2):218-9.
24. Fürst R, Carvalho GR, Fürst COM, Ruas JRM, Borges AM, Mafilli V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2005;57(5):599-07.