

Concentração de lactato de cálcio e tempo de incubação sobre a capacidade de adesão e penetração de espermatozoides suínos na membrana perivitelina do ovo da galinha

Calcium lactate concentration and incubation period on the binding and penetration capacity of swine sperm in the perivitelline membrane of chicken egg

Carine Dahl Corcini^I Betris Elert da Silva^{II} Rosa Marani Rodrigues Brizolara^{II}
Stela Mari Meneguello Gheller^{III} Antonio Sergio Varela Junior^{IV} Denise Calisto Bongalharo^{II}
Thomaz Lucia Junior^{III}

RESUMO

Este estudo testou o efeito de diferentes concentrações de lactato de cálcio e tempos de incubação sobre a capacidade de adesão e a penetração dos espermatozoides suínos nas membranas perivitelinas (MP) de ovos de galinhas, na expectativa de desenvolver um teste para estimar o potencial de fertilidade de machos doadores de sêmen. No primeiro experimento, amostras de sêmen (n=12) foram incubadas em meio TCM com lactato de cálcio a 1,1 e 2,2µg mL⁻¹. Posteriormente, após definida a concentração de 1,1µg mL⁻¹ de lactato de cálcio, um segundo experimento comparou três períodos de incubação a 39°C: 10, 15 e 20min. As respostas testadas foram: a taxa de adesão (TA) e o número de espermatozoides aderidos (NA) na MP externa, e a taxa de penetração (TP) e o número de orifícios (NO) na MP interna. A TA na MP externa foi de 100%, independentemente da concentração e dos períodos testados. Com a concentração de lactato de cálcio de 1,1µg mL⁻¹, o NA na membrana perivitelina externa e TP e NO na membrana perivitelina interna foram superiores (P<0,05) aos com 2,2µg mL⁻¹. O NA foi superior com incubação por 20min, em comparação aos períodos mais curtos (P<0,05). No período de incubação por 10min, não houve penetração na MP interna. Porém, com 20min de incubação, a TP na MP interna e o NO foram superiores aos obtidos com a incubação por 15min (P<0,05). A concentração de 1,1µg mL⁻¹ de lactato de cálcio e o período de incubação por 20min permitem a execução eficiente de testes in vitro usando MP para verificar etapas importantes do processo de fertilização.

Palavras-chave: fertilidade, sêmen, teste in vitro, qualidade seminal.

ABSTRACT

This study tested the effect of different calcium lactate concentrations and incubation periods on the binding

and penetration capacity of swine sperm to the perivitelline layers (PL) of chicken eggs, with the expectation of developing a test to estimate the potential fertility of boars used as sperm donors. In the first experiment, semen samples (n=12) were incubated with TCM medium and two calcium lactate levels: 1.1 and 2.2µg mL⁻¹. After the set up of fixed calcium lactate level (1.1µg mL⁻¹), the second experiment compared three incubation periods: 10, 15 and 20min. The observed variables were binding rate (BR) and number of bound sperm (NB) in the outer PL, and penetration rate (PR) and number of holes (NH) in the inner PL. The BR to the outer MP was 100%, regardless of the tested concentrations and incubation periods. The NB to the outer perivitelline layer and the PR and the NH in the inner perivitelline layer were greater with 1.1µg mL⁻¹ calcium lactate than 2.2µg mL⁻¹. The NB in the outer PL was greater with 20min incubation than with shorter period (P<0.05). Using 10min incubation, there was no penetration in the inner PL, but, with incubation for 20min, the PR and the NH in the inner PL were greater than those with incubation for 15 min (P<0.05). Using 1.1µg mL⁻¹ calcium lactate and incubation for 20min, the in vitro test using PL can be efficiently conducted to assess important steps of the fertilization process.

Key words: fertility, semen, in vitro test, seminal quality.

INTRODUÇÃO

As avaliações convencionais de qualidade seminal (motilidade, vigor e morfologia espermática) apresentam eficiência relativa, com limitada capacidade de identificar diferenças de menor magnitude, entre machos com potencial de fertilidade mais homogêneo (GADEA, 2005). Essas análises convencionais teriam

^ICentro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), 96010-610, Pelotas, RS, Brasil. E-mail corcinicd@gmail.com. Autor para correspondência.

^{II}Instituto de Biologia, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

^{III}Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

^{IV}Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil

condições de detectar somente em torno de 44% dos machos com baixa fertilidade (ROCHA et al., 2005). Portanto, machos subfértéis podem, eventualmente, ser utilizados na rotina de programas de inseminação artificial (IA). Além disso, estas avaliações apresentam baixa associação com a fertilidade e são sensíveis a variações de características individuais atribuídas aos machos doadores de sêmen (XU et al., 1998; POPWELL & FLOWERS, 2004; MACEDO et al., 2006). Portanto, existe a necessidade de desenvolvimento de métodos *in vitro* eficientes no diagnóstico do potencial de fertilização dos espermatozoides suínos.

Entre os testes que podem ser utilizadas para prever a fertilidade de machos suínos, podem ser citados: o teste de penetração espermática *in vitro* em ovócitos homólogos (LARSSON & RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2000; POPWELL & FLOWERS, 2004; MACEDO et al., 2006; 2010) e o teste de fertilização *in vitro* (PELÁEZ et al., 2006). Entretanto, esses testes são relativamente trabalhosos e onerosos, inviabilizando a sua utilização na rotina de centrais de IA, o que justifica o desenvolvimento de outros métodos de avaliação *in vitro*.

Entre os testes alternativos que podem ser usados para a seleção de machos com maior potencial fertilizante, podem ser citados: o teste de penetração na membrana perivitelina (MP) interna de ovos de galinhas, anteriormente utilizado para sêmen de galos (ROBERTSON & WISHART, 1997) e o teste de adesão na MP externa, já utilizado para sêmen de humanos e de camundongos (BARBATO et al., 1998).

Para a realização eficiente de testes *in vitro*, o meio de co-incubação deve conter componentes que promovam a manutenção e a capacitação dos espermatozoides, a reação acrossomal e a fertilização. O lactato de cálcio é capaz de estimular a capacitação espermática e/ou a reação acrossomal em espermatozoides suínos (ABEYDEERA & DAY, 1997). Além disso, há uma grande variação no tempo de co-incubação dos gametas, mesmo que a maioria dos protocolos utilize co-incubação por 6h (ABEYDEERA & DAY, 1997; MACEDO et al., 2006). Entretanto, GIL et al. (2004) observaram que, com períodos de co-incubação entre 10 e 30min, ocorre um aumento no número de espermatozoides por ovócito penetrado. Porém, uma vez que os testes de adesão e penetração *in vitro* nas MP de ovos de galinhas ainda não foram conduzidos com sêmen suíno, é necessário determinar a concentração de lactato de cálcio e o período de incubação mais eficientes para a condução deste teste.

O objetivo deste estudo foi testar o efeito de diferentes concentrações de lactato de cálcio e

períodos de incubação sobre a capacidade de adesão e penetração *in vitro* de espermatozoides suínos nas MP interna e externa de ovos de galinhas.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sêmen avaliadas neste experimento (12 ejaculados) foram colhidas de três machos suínos sexualmente maduros e com fertilidade comprovada através de taxas de partições acima de 85%. Os reprodutores, pertencentes a uma central de IA comercial, localizada no município de Pelotas-RS, foram submetidos a uma frequência de colheitas de duas vezes por semana, durante o período de um mês. Imediatamente após a colheita, os ejaculados foram diluídos em Beltsville Thawing Solution (BTS), obtendo a concentração de $3,5 \times 10^9$ espermatozoides 100mL^{-1} (PURSEL & JOHNSON, 1975). A avaliação da concentração espermática dos experimentos foi realizada no espectrofotômetro, programado com comprimento de onda de 550nm. As amostras foram transportadas para o laboratório da Reprodução da UFPel, a temperatura de 24°C até no máximo de 1h antes da execução das avaliações. Somente foram utilizados ejaculados com motilidade igual ou superior a 80%. Os parâmetros de qualidade seminal avaliados logo após a diluição do sêmen foram motilidade e morfologia espermáticas. Todas as substâncias químicas utilizadas neste experimento eram de procedência da *Sigma Chemical Company* (St. Louis, MO – USA).

A motilidade espermática foi avaliada por microscopia ótica de contraste de fase, sob aumento de 200X (BEARDEN & FUQUAY, 1997), sempre pelo mesmo técnico treinado. A morfologia espermática foi avaliada segundo o protocolo de HANCOCK (1959), com a contagem de 200 células em microscopia ótica com contraste de fase.

As MP foram provenientes de ovos de galinhas, frescos e não férteis, tendo sido isoladas conforme descrito por ROBERTSON & WISHART (1997). No primeiro experimento, com o objetivo de avaliar as diferentes concentrações de lactato de cálcio, foi utilizado meio composto por: meio de cultura de tecidos (TCM) 199; 0,91mM de piruvato; 5,5mM de glicose; 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina; e lactato de cálcio em duas concentrações (1,1 ou 2,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Este meio foi descrito anteriormente por MACEDO et al. (2006) para o teste de penetração *in vitro* de sêmen suíno em ovócitos homólogos. Aproximadamente 10min antes do teste, os ejaculados foram submetidos à centrifugação a 900g por 3min, para remover o BTS e não alterar o meio de fertilização.

O volume de pellet do sêmen correspondente a 1×10^6 espermatozoides por mL foi adicionado diretamente a 750 μ L do meio de fertilização. As MP foram incubadas durante 20min com os espermatozoides em banho-maria a 39°C, sem atmosfera controlada e sem agitação.

No segundo experimento, com o objetivo de avaliar os diferentes tempos de incubação, a concentração de lactato de cálcio utilizada foi de 1,1 μ g mL⁻¹, indicado pelo primeiro experimento. Foram comparados três períodos de incubação: 10, 15 e 20min. Após esses períodos, as MP foram lavadas para a retirada dos espermatozoides não aderidos e esticadas sobre uma lâmina. O corante fluorescente Hoechst 33342 foi adicionado sobre a MP externa, para a contagem do número de espermatozoides aderidos sob luz ultravioleta (filtro de excitação BP 330 - 385), em microscópio de epifluorescência, em aumento de 200X.

As lâminas contendo as MP internas foram observadas em microscópio de campo escuro, sob aumento de 200X. Três campos da lâmina foram fotografados, para a contagem do número de pontos de orifícios, representando os pontos de hidrólise na MP interna. Posteriormente, foi calculado o número médio de orifícios por mm².

No experimento 1, foram comparadas duas concentrações de lactato de cálcio, enquanto, no experimento 2, foram comparados três períodos de incubação. Em ambos os experimentos, as amostras foram colhidas de três machos, tendo sido realizadas quatro repetições. Estatísticas descritivas foram calculadas para motilidade e morfologia espermáticas. Todas essas variáveis foram avaliadas pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. De acordo com esse teste, o número de espermatozoides aderidos à MP externa e penetrando na MP interna entre as concentrações de lactato e os tempos de incubação não apresentaram distribuição normal ($P < 0,05$). Em função disso, os dados foram analisados através de testes não-paramétricos (teste de Wilcoxon, no experimento 1, e análise de variância de Kruskal-Wallis, no experimento 2).

Comparações das taxas de adesão na MP externa e de penetração na MP interna (considerando presença ou ausência de espermatozoides e de orifícios, respectivamente) foram feitas pelo teste exato de Fischer, considerando o nível de $p < 0,05$ para diferenças significativas. As análises estatísticas foram realizadas com o software STATISTIX (2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias de motilidade e o percentual de espermatozoides normais foram de $90,0 \pm 5,3\%$ e $94,0 \pm 2,3\%$, respectivamente. A média geral do número de espermatozoides aderidos na membrana perivitelina externa foi de $37,5 \pm 35,8$ e o número de orifícios na membrana perivitelina interna por mm² foi igual a $5,2 \pm 2,9$.

Este estudo foi conduzido com intuito de determinar se espermatozoides suínos são capazes de reagir com a membrana perivitelina do ovo de galinha (MP) de maneira similar ao observado com outras espécies. A concentração de 1,1 μ g mL⁻¹ de lactato de cálcio apresentou respostas superiores às observadas com a concentração de 2,2 μ g mL⁻¹ ($P < 0,05$), tanto para a MP externa, quanto para a MP interna (Tabela 1). A maior concentração de lactato de cálcio influenciou negativamente na adesão dos espermatozoides na MP externa e na penetração e orifício na MP interna, o que pode ser consequência de uma indução precoce da capacitação espermática e da reação acrossomal, antes da interação com as proteínas da zona pelúcida (ABEYDEERA & DAY, 1997).

O número de espermatozoides aderidos na MP externa e o número de orifícios na MP interna foram maiores com incubação por 20min (Tabela 2), em um meio já utilizado anteriormente para a realização de teste de penetração *in vitro* da espécie suína (MACEDO et al., 2006; 2010). Esse período de incubação é condizente com os achados de FUNAHASHI & ROMAR (2004), que não observaram diferença na taxa de penetração *in vitro*, com co-incubação de gametas suínos no intervalo de 5 a 30min, sem agentes capacitantes.

Tabela 1 - Taxa de adesão (TA) e número de espermatozoides suínos aderidos (NA) na membrana perivitelina (MP) externa e taxa de penetração (TP) e número de orifícios (NO) na MP interna do ovo de galinha em função da concentração de lactato de cálcio.

Concentrações de Lactato de cálcio	----Membrana perivitelina externa----		----Membrana perivitelina interna----	
	TA (%)	NA	TP (%)	NO
1,1 μ g mL ⁻¹	100	$72,0 \pm 17,7^A$	$88,9^F$	$9,6 \pm 2,1^A$
2,2 μ g mL ⁻¹	100	$14,3 \pm 17,1^B$	$44,4^G$	$1,1 \pm 2,1^B$

^{A,B} Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Wilcoxon Rank Sum Test ($P < 0,005$) e

^{F,G} letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste exato de Fischer ($P < 0,05$), (n=12 ejaculados).

Tabela 2 - Taxa de adesão (TA) e número de espermatozoides suínos aderidos (NA) na membrana perivitelina (MP) externa e taxa de penetração (TP) e número de orifícios (NO) na MP interna do ovo de galinha em função do tempo de incubação (n=12 ejaculados).

Período de Incubação (min)	----Membrana perivitelina externa----		----Membrana perivitelina interna----	
	TA (%)	NA	TP (%)	NO
10	100	11,7 ± 9,6 ^B	0 ^H	0,0 ± 0,0 ^C
15	100	23,5 ± 2,12 ^B	50 ^G	0,5 ± 0,7 ^B
20	100	68,3 ± 9,19 ^A	100 ^F	6,0 ± 2,1 ^A

^{A,B,C} Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05) e ^{F,G,H} letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste exato de Fischer (P<0,05).

Os machos avaliados não diferiram quanto ao potencial de adesão espermática na MP externa do ovo de galinha. Esses resultados sugerem que tal variável pode não ser útil na observação de diferenças na potencial fertilidade entre indivíduos, uma vez que resultados positivos foram observados em 100% das amostras, independentemente da concentração de lactato de cálcio (Tabela 1) e do período de incubação (Tabela 2).

O teste SBA (*Sperm-Binding Assay*), que utiliza substrato sintético da MP não apresentou resultados consistentes em suínos (REIS et al., 2003), o que pode ser atribuído à presença de proteínas da MP externa e interna. No segundo experimento do presente trabalho, a ocorrência de 100% de TA, independente do meio ou tempo de incubação, sugere que os espermatozoides não necessitam sofrer reação acrossomal para aderirem à MP externa. FAZELI et al. (1997) relataram que 8% dos espermatozoides aderidos a ovócitos apresentavam o acrossoma íntegro, mesmo após co-incubação por 6h. REIS et al. (2003) observaram diferenças entre machos, quanto à capacidade de ligação de seus espermatozoides ao substrato sintético do teste SBA, somente após 72h de armazenamento, mas o número de células espermáticas aderidas foi maior quando albumina sérica bovina (BSA) foi acrescida ao diluente. Porém, essa condição experimental não pode ser repetida, pois a concentração de BSA acrescida ao diluente não foi informada. Além de não ter apresentado resultados consistentes, o teste SBA necessita de equipamento específico e de um período longo (19h) para a sua execução, o que dificulta a sua implantação na rotina das centrais de IA, em função dos custos elevados.

A confiabilidade no teste de adesão a MP externa pode ser questionada, uma vez que os espermatozoides que não sofreram o processo de capacitação, reação do acrossoma e transposição da zona pelúcida podem se aderir à MP externa

(ROBERTSON et al., 2000). Já no teste de penetração na MP interna, são avaliados diretamente os orifícios provocados pela ação hidrolítica das enzimas acrossomais, após o processo de capacitação espermática. Outro aspecto importante a ser considerado é que a MP interna é composta por proteínas ZPb-ZPc, com alta homologia com as proteínas ZP3 encontradas em ovócitos suínos (MUGNIER et al., 2009), fazendo com que se espere uma alta correlação entre o número de orifícios mm² de MP interna e a capacidade fecundante dos espermatozoides suínos *in vivo*. Dessa forma, o teste de penetração espermática *in vitro* na MP interna pode ser considerado mais eficiente do que o teste com a MP externa, por refletir não somente a capacidade de adesão do espermatozoide, mas também sua habilidade em sofrer a reação acrossomal e hidrolisar a membrana.

Os resultados obtidos com a incubação por 20min podem viabilizar a adequação do teste de penetração *in vitro* na MP para ser usado na rotina em centrais de IA, em função de sua rápida execução e por utilizar equipamentos que estão normalmente disponíveis nessas instalações. Por outro lado, sua utilização nessas condições deverá ser validada em estudos futuros, através de comparações entre os resultados observados *in vitro* com a fertilidade *in vivo*.

CONCLUSÃO

O teste de penetração *in vitro* de espermatozoides suínos na membrana perivitelina interna de ovos de galinhas pode ser realizado de forma eficiente com o uso do meio TCM com 1,1µg mL⁻¹ de lactato de cálcio e com incubação por 20min.

AGRADECIMENTO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

- ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N. In vitro penetration on pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. **Theriogenology**, v.48, p.537-544, 1997. Disponível em: <[http:// dx.doi.org/10.1016/S0093-691x\(97\)00270-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691x(97)00270-7)>. Acesso em: 10 mar. 2010. doi:10.1016/S0093-691X(97)00270-7.
- BARBATO, G.F. et al. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertile males. **Biology of Reproduction**, v.58, p.686-699, 1998. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/58/3/686.full.pdf+html>>. Acesso em: 10 mar. 2010.
- BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied animal reproduction**. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p.159-170.
- FAZELI, A.; et al. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucid *in vitro*. **Biology of reproduction**, v.56, p.430-438, 1997. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/56/2/430.long>>. Acesso em: 10 mar. 2010. doi:10.1095/biolreprod56.2.430.
- FUNAHASHI, H.; ROMAR, R. Reduction of the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes by pre-treatment of fresh spermatozoa with adenosine and a transient co-incubation of the gametes with caffeine. **Reproduction**, v.128, p.789-800, 2004. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/cgi/reprint/128/6/789>>. Acesso em: 11 mar. 2011. doi:10.1530/rep.1.00295.
- GADEA, J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. **Theriogenology**, v.63, p.431-444, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04003127>>. Acesso em: 10 mar. 2010. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.023.
- GIL, M.A. et al. Effect of short periods of sperm-oocyte co incubation during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. **Theriogenology**, v.62, p.544-552, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X03004175>>. Acesso em: 10 mar. 2010. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.11.001.
- HANCOCK, J.L. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, v.71, p.664-665, 1959.
- LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use *in vitro* fertilization test to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.327-336, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432000000890>>. Acesso em: 10 mar. 2010. doi:10.1016/S03784320(00)00089-0.
- MACEDO, M.C. Jr. et al. *In vitro* penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. **Animal Reproduction Science**, v.92, p.334-348, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432005001697>>. Acesso em: 10 mar. 2010. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.05.030.
- MACEDO M.C. Jr. et al. *In vitro* penetration of swine oocytes by homologous spermatozoa: distinct systems for gamete's coincubation and oocyte's cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.117, p.295-301, 2010. Disponível em: <<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/anirep/article/S03784320%2809%2900143-2>>. Acesso em: 10 mar. 2010. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.05.013.
- MUGNIER, S. et al. New insights into the mechanisms of fertilization: comparison of the fertilization steps, the composition, and the structure of the zona pellucid between horses and pigs. **Biology of Reproduction**, v.81, p.856-870, 2009. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/81/5/856.full.pdf+html?sid=f12b1a5a-4877-4739-955a-5776c919886b>>. Acesso em: 10 mar. 2010. doi:10.1095/biolreprod.109.07765.
- PELÁEZ, J. et al. *In vitro* evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0.25 ml straws. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.153-161, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2006.00659.x/abstract?sessionid=0D14D901F3D42E1DBE21AC4AE5C5105E.d01t03>>. Acesso em: 10 mar. 2010. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00659.x.
- POPWELL, J.M., FLOWERS, W.L. Variability in relationships between semen quality and estimates of *in vitro* fertility in boars. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.97-113, 2004. Disponível em: <<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/anirep/article/S0378-4320%2803%2900186-6/abstract>>. Acesso em: 10 mar. 2010. doi:10.1016/j.anireprosci.2003.08.007.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Freezing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal Animal Science**, v.40, p.99-102, 1975. Disponível em: <<http://jas.fass.org/cgi/reprint/40/1/99>>. Acesso em: 10 mar. 2010.
- REIS, G.R. et al. Fertilidade de sêmen suíno avaliada pelo teste de ligação dos espermatozoides a um substrato sintético. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.1343-1349, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2003001100014>. Acesso em: 11 mar. 2011. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2003001100014.
- ROBERTSON, L.; WISHART, G.J. *In vitro* sperm-egg interaction assay utilizing inner perivitelline layer from laid chicken eggs. In: BAKST, M.R.; CECIL, H.C. (Eds.). **Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination**. Savoy, IL: Poultry Science Association, 1997. p.64-67.
- ROBERTSON, L. et al. Identification of perivitelline N-linked glycans as mediators of sperm-egg interaction in chickens. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.120, p.397-403, 2000. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/120/2/397.long>>. Acesso em: 11 mar. 2011.
- ROCHA, G. et al. Factores que afectan la producción de dosis de semen en centros de inseminación artificial porcina. **Avances en Investigación Agropecuaria**, v.9, p.33-43, 2005. Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=83790304>>. Acesso em: 11 mar. 2011.
- STATISTIX® - **Statistix® 8 Analytical software**. Tallahassee, FL. 2003. 454p.
- XU, X. et al. *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**, v.76, p.3079-3089, 1998. Disponível em: <<http://jas.fass.org/cgi/reprint/76/12/3079>>. Acesso em: 10 mar. 2010.