

LETÍCIA BERGO COELHO FERREIRA

**BIOQUÍMICA DO PLASMA SEMINAL E EFEITO DO EDTA ADICIONADO  
AO MEIO DE CONGELAMENTO DO SÊMEN DE CÃO DOMÉSTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F383b  
2013

Ferreira, Leticia Bergo Coelho, 1988-  
Bioquímica do plasma seminal e efeito do EDTA adicionado  
ao meio de congelamento do sêmen de cão doméstico / Leticia  
Bergo Coelho Ferreira. – Viçosa, MG, 2013.  
viii, 42 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 30-40.

1. Cão - Reprodução. 2. Sêmen - Análise. 3. Bioquímica.  
4. Ácido etilenodiaminotetraacético. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.08926

LETÍCIA BERGO COELHO FERREIRA

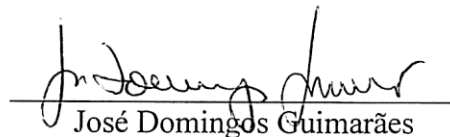
**BIOQUÍMICA DO PLASMA SEMINAL E EFEITO DO EDTA ADICIONADO  
AO MEIO DE CONGELAMENTO DO SÊMEN DE CÃO DOMÉSTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

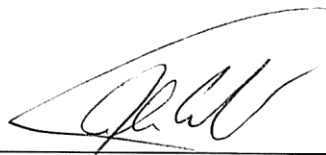
APROVADA: 15 de março de 2013.



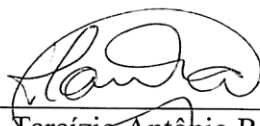
Eduardo Paulino da Costa



José Domingos Guimarães



Antonio Carlos Csermak Junior



Tarcízio Antônio Rego de Paula  
(Orientador)

*“O ser humano vivencia a si mesmo e seus pensamentos como algo separado do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. Essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas próximas. Nossa principal tarefa é nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar esse objetivo completamente, mas lutar pela sua realização já é parte de nossa libertação e o alicerce de nossa segurança interior.”*  
(Albert Einstein, 1950)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, José Ferreira e Cláudia Bergo e minha irmã Lívia, pelo apoio e incentivo que sempre me deram, além de todo o aprendizado que tive acesso por conviver de forma tão próxima, com pessoas tão sábias, éticas e de boa índole. Além disso, agradeço pela ajuda direta com a dissertação, na correção do português e tradução do resumo para o inglês.

Agradeço ao professor Tarcízio pelas tantas coisas que aprendi nos anos de graduação e mestrado, pela confiança e pelo apoio. Agradeço ao Juliano Peixoto, Moacir Carretta, Marcos Rodrigues, Thyara Deco, Gediendson Araújo e Carlão Csermak pelas tantas coisas que me ensinaram nestes anos de atividades no CETAS e no Projeto Suçuarana.

Agradeço aos doutores José Domingos Guimarães, Eduardo Paulino da Costa e Antonio Carlos Csermak Jr. por participarem da banca e pela ajuda direta e indireta que deram no decorrer do experimento. Ao professor Eduardo Paulino pela ajuda principalmente com as análises estatísticas.

Agradeço às avós Neli e Flora pelo carinho, aos meus avôs (*in memoriam*) José Ferreira e Xisto, sempre presentes nas minhas lembranças. Aos meus tios, tias, primos e primas, principalmente tias Leila e Daisy por serem tão especiais e acolhedoras.

Agradeço pelas “quebradas de galho”, apoio, amizade, entre muitas outras coisas, aos colegas de pós graduação: Gediendson, Thyara, Carlão, Marcos, Moacir, Mariana, Leanes, Natasha, Grazi, Vinícius e Luana.

Devo um agradecimento especial à equipe do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Pequenos Animais e Animais Silvestres: Gê, Thyara e Carlão, que atuaram junto ao professor Tarcízio na montagem e reforma do laboratório para que eu pudesse realizar o experimento. Agradeço à Thyara, o Gê e o Bruno pela ajuda na correção das referências bibliográficas e formatação da dissertação.

Agradeço aos estagiários Saullo, Paulo, Fernanda, Jade, Isabela, Juliana e Ana, que foram essenciais para o bom funcionamento (e construção) do laboratório.

Agradeço aos sujeitos principais deste trabalho, os cães Athos, Marlon e Lavrador pela doação do sêmen e por serem tão carinhosos, alegrando muitos dos meus dias estressantes. Me esforçarei para conseguir bons lares para eles.

Agradeço o CNPq pela concessão de bolsa e, juntamente com a FAPEMIG, pelo financiamento para montagem do laboratório.

## RESUMO

FERREIRA, Letícia Bergo Coelho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Bioquímica do plasma seminal e efeito do edta adicionado ao meio de congelamento do sêmen de cão doméstico.** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Um dos principais fatores deletérios, inerentes ao processo de congelamento de sêmen canino, é a grande quantidade de lesões de membranas espermáticas observada ao descongelamento. O congelamento induz a desestabilização das membranas celulares e alterações na conformação de receptores e canais iônicos, promovendo influxo de cálcio para o citosol, aumentando a chance de ocorrer prematuramente a reação acrossomal (RA), o que pode inviabilizar a fertilização do ovócito. O cálcio é reconhecido como o principal agente indutor da RA em espermatozoides de mamíferos. Não existem relatos recentes sobre meios de congelamento de sêmen de cão que contenham concentrações de cálcio preventivas à RA prematura. Os objetivos deste estudo foram avaliar quantitativamente a concentração dos cátions cálcio, sódio e potássio e da enzima fosfatase alcalina nas frações dos ejaculados de cães e também testar o efeito da redução da quantidade de cálcio no meio de congelamento utilizando o EDTA como quelante. Utilizou-se ejaculados de três cães mestiços, coletando em separado a fração rica em espermatozoides (FR) e a fração prostática (FP). Ambas foram avaliadas por espectrofotometria para aferição das concentrações dos cátions e da FA, assim como os meios de congelamento utilizados. O sêmen fresco foi avaliado por meio de testes clássicos (vigor, motilidade, hiposmótico e morfologia espermática) e o restante foi dividido em três alíquotas para diluição em meio base de congelamento tris-citrato-gema de ovo com glicerol e equex, meio básico contendo 0,1% de EDTA e meio básico contendo 0,25% de EDTA. O cátion estudado que se apresentou mais abundante no plasma seminal foi o sódio, seguido pelo potássio e o cálcio, tanto na FR quanto na FP, não havendo diferença entre as concentrações em ambas as frações ( $p > 0,05$ ). A FA obtida na FR foi maior que a obtida na FP ( $p < 0,05$ ). Observou-se elevada concentração de cálcio no meio base de congelamento, a qual foi reduzida nos tratamentos com EDTA ( $p < 0,05$ ). Houve efeitos deletérios em todos os parâmetros analisados no sêmen descongelado em comparação com o sêmen fresco (vigor, motilidade, integridade de membrana plasmática e morfologia). Não foi observada diferença na avaliação de lesões nas membranas plasmática e acrossomal com uso de sondas fluorescentes entre os

meios com diferentes concentrações de EDTA ( $p > 0,05$ ). Embora o uso de EDTA tenha reduzido o cálcio extracelular, a concentração deste cátion permaneceu alta em comparação com sua concentração original no plasma seminal, fator que pode ser responsável pela não redução de lesões de membrana acrossomal nos tratamentos com EDTA. Por outro lado o EDTA não apresentou efeito deletério sobre os espermatozoides de acordo com os parâmetros avaliados.

## ABSTRACT

FERREIRA, Letícia Bergo Coelho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Biochemical of the seminal plasm and edta efect added to the freezing medium of the domestic dog semen.** Adviser: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

One of the main deleterious factors inherent to the process of canine semen freezing is the large amount of sperm membranes lesions observed in the thawing. The freezing induce some destabilization of cell membrane and changes in the conformation between membrane receptors and ionic channels, promoting the calcium influx and increasing the probability of a premature acrosome reaction (AR), that invalidate the fertilization of the oocyte. The calcium is the principal inducing agent of the AR *in vitro*, and there is not recent reports about the biochemical composition of the seminal plasm and about the calcium levels that prevent the premature AR in the frozen of the domestic dog semen too. This study aimed to evaluate the alkaline phosphatase and cationic composition in seminal plasma of the fractions of dog ejaculate; and also test the effects of calcium amount reducing in freezing medium using the EDTA as a chelating agent. The semen was collected from three half-breed dogs. The sperm-rich fraction (SRF) and the prostatic fraction (PF) were separately collected. Both samples were evaluated by spectrophotometry, measuring the concentrations of calcium, sodium, potassium, alkaline phosphatase (AP), and the freezing medium. The fresh semen was evaluated by classical tests (strength, progressive motility, morphology, and membrane integrity). The remainder was divided into three aliquots that were diluted in a freezing medium based on tris-citrate-egg yolk, glycerol and equex with different concentrations of EDTA. The first treatment did not contain EDTA, treatment 2 contained 0.1% EDTA and the third, 0.25%. The most abundant cation in seminal plasma of these dogs was sodium, followed by potassium and calcium, respectively, both in SRF and in PF, without significant difference between the concentrations of these ions in both fractions. The AP obtained in SRF was significantly higher ( $p < 0.000001$ ) than that obtained in PF. There was a high concentration of calcium in the freezing medium based, that was significantly reduced in the treatments with EDTA. Deleterious effects were observed in all analyzed parameters in thawed semen compared with fresh semen (progressive motility, morphology, and membrane integrity). With the use of fluorescent probes, we did not note significant difference in the percentage of the plasmatic membranes e acrosomal membranes injured among the treatments with different EDTA

concentrations. The extracellular medium has high calcium concentration, and despite the EDTA had significantly reduced the extracellular calcium in those treatments that it was added, there was not acrosomal membrane injury reduction in these treatments. This may have been caused because the concentration of this cation still remained high in comparison with its concentration in the original seminal plasma. We note too that the EDTA did not presented deleterious effects on the spermatozoa inside the evaluated parameters.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
3.1 Objetivo geral.....	13
3.2 Objetivos específicos .....	13
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
4.1 Animais e coletas .....	14
4.2 Padronização da concentração e avaliação do sêmen fresco .....	14
4.3 Congelamento e avaliação do sêmen descongelado .....	15
4.4 Teste de integridade de membrana plasmática e acrossomal.....	16
4.5 Teste de termorresistência.....	17
4.6 Mensuração da composição bioquímica .....	17
4.7 Análise estatística.....	18
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>18</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>29</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>30</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>41</b>
8.1 Anexo I: Composição dos meios utilizados.....	41
8.2 Anexo II: Diluições dos fluoróforos para preparo das soluções estoque e de trabalho das sondas fluorescentes .....	42

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de pesquisas em fisiologia reprodutiva e de técnicas de reprodução assistida para carnívoros busca o aprimoramento de protocolos que melhorem as taxas de concepção e possibilitem intercâmbio genético entre indivíduos distantes geograficamente. O desenvolvimento de protocolos eficazes de criopreservação de sêmen de cão pode auxiliar no melhoramento de raças e prover aproveitamento máximo do potencial reprodutivo de animais padreadores (Messias, 2000). O peculiar processo de seleção do cão doméstico levou a grande heterogeneidade morfológica, comportamental e a algumas variações reprodutivas entre raças (Honeycutt, 2010). O processo de melhoramento genético no cão difere muito do realizado em outras espécies domésticas: a melhora reprodutiva e produtiva é pouco ou nada considerada nos programas de melhoramento de raças caninas.

Esta espécie apresenta ciclo reprodutivo com algumas peculiaridades, as quais dificultam o manejo reprodutivo (Farstad, 2000). As técnicas de reprodução assistida em cães podem ser usadas como modelo para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida para espécies de carnívoros silvestres (Farstad, 2000; Goodrowe *et al.*, 2000; Paula, 2011).

Desde o processo de espermatogênese até a ligação com a zona pelúcida dos ovócitos, os espermatozoides passam por alguns importantes processos visando permitir que a fertilização aconteça. Durante o transporte e armazenamento no epidídimo, eles sofrem maturação funcional e ao entrarem em contato com os órgãos genitais femininos, eles passam por um processo denominado capacitação que os torna aptos a se ligarem à zona pelúcida do gameta feminino e sofrer reação acrossômica (RA) (Witte & Schäfer-Somi, 2007; Gadella, 2008). A reação acrossomal é um evento de excitose, extremamente regulado e dependente dos eventos que ocorrem na capacitação (Breitbart, 2002). Após a ligação com a zona pelúcida, a membrana externa do acrossoma se funde à membrana plasmática, liberando o conteúdo de forma irreversível (Breitbart, 2002; De Blas *et al.*, 2005; Witte & Schäfer-Somi, 2007; Costa *et al.*, 2010). Este processo é extremamente dependente do influxo de  $Ca^{2+}$  (Spungin & Breitbart, 1996; Brewis *et al.*, 2001; Breitbart, 2002; Witte & Schäfer-Somi, 2007).

A inseminação artificial (IA) utilizando sêmen fresco e resfriado é amplamente utilizada em reprodução de cão e apresenta bons resultados. Entretanto, estudos testando IA com sêmen descongelado não apresentaram resultados satisfatórios (Farstad, 1984;

Linde-Forsberg & Forsberg, 1989; Linde-Forsberg & Forsberg, 1993; Silva, 1995; Silva *et al.*, 1996). Apesar dos bons resultados observados em IA com sêmen fresco e resfriado, estas opções nem sempre são viáveis devido ao curto tempo de conservação, como alternativa o sêmen congelado pode ser armazenado por período de tempo indeterminado.

Para se melhorar o processo de congelamento de espermatozoides, deve-se levar em consideração que todas as etapas do processamento podem alterar a arquitetura das suas membranas, e dessa forma, influenciar a viabilidade e capacidade de fertilização (Gadella, 2008). Dentre os danos inerentes ao congelamento, pode-se destacar o choque térmico, a cristalização e dissolução de cristais de gelo e a exposição da célula a estresse osmótico, devido a exposição a diferentes concentrações de solutos (Oettlé, 1986; Amman & Pickett, 1987; Watson, 2000; Cunha, 2002). Além disso, a desestabilização da membrana pode estimular uma RA prematura. O mecanismo deste estímulo não está bem elucidado, mas sabe-se que a alteração na conformação de receptores e canais iônicos modifica o padrão de influxo de cálcio para a célula.

Diluidores de sêmen para congelamento podem reduzir as lesões oriundas dos fatores estressantes aos espermatozoides durante as oscilações térmicas. Entretanto, nenhum dos componentes dos diluidores mais comumente utilizados em congelamento de sêmen de cães minimiza a incidência de RA prematura. Considerando-se que o cálcio é um importante mediador deste processo, estudos foram conduzidos em caprinos, bovinos e ovinos testando o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como quelante (Lee *et al.*, 1996, Aisen *et al.*, 2000; Cunha & Lopes, 2005; Bittencourt *et al.*, 2008). Essa substância reduz a disponibilidade de cálcio no meio extracelular, diminuindo seu influxo para o citosol, o que minimiza a incidência de reação acrossomal prematura (Amann & Pickett, 1987).

O ejaculado é composto por espermatozoides e plasma seminal, sendo este composto por diversas substâncias, dentre elas monossacarídeos, enzimas e íons, a exemplo do cálcio. A importância de alguns destes componentes para a fertilidade é discutida, mas sabe-se que algumas substâncias estão relacionadas à inibição da capacitação, bem como enzimas e proteínas que atuam durante o transporte nos órgãos genitais da fêmea (Souza, 2007). Além destas, algumas substâncias funcionam como marcadores seminais, as quais podem predizer a fertilidade dos animais e indicar a origem de frações do ejaculado (Souza, 2010). Existem poucos estudos recentes sobre a composição e função dos elementos bioquímicos do ejaculado canino.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Existem evidências que o surgimento da espécie *Canis familiaris* ocorreu devido à seleção humana dos indivíduos da espécie antecessora com habilidades úteis às comunidades primitivas. Evidências baseadas em análises filogenéticas com marcadores de DNA apontam o lobo cinzento, *Canis lupus*, como ancestral do cão doméstico (Vilà *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 2001; Shelling *et al.*, 2005; Honeycutt, 2010). Existe cerca de 98% de compatibilidade entre o DNA mitocondrial de cães e lobos (*Canis lupus*) (Galibert *et al.*, 2011).

Os cães são elementos cada vez mais importantes na construção de identidades na sociedade contemporânea (Dal-Farra, 2004). Eles exercem funções que o ser humano não é capaz de exercer e que não há tecnologia que simule, incrementam grupos familiares e movimentam certa parcela da economia mundial. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET), o faturamento com o setor “PET”, no Brasil, já ocupa o segundo lugar mundial, perdendo apenas para os EUA. O setor movimentou R\$ 12,2 bilhões em 2011 e R\$ 13,6 bilhões em 2012 (ABINPET, 2012). Segundo a pesquisa Euromonitor, existem quase 20 milhões de cães de pequeno porte domiciliados no Brasil, sendo o país que apresenta maior população de cães *per capita* no mundo (Bradley & King, 2012).

A grande variação morfológica e comportamental existente nessa espécie não é observada em outra conhecida, dentre as teorias explicativas para tal, algumas controversas, Verginelli *et al.* (2005) e Honeycutt (2010) sugerem múltiplas origens de cães provenientes de diferentes unidades populacionais de lobos, aliadas à ocorrência de retrocruzamentos contínuos entre cães e lobos subsequentes à domesticação (Vilà *et al.*, 1997). As habilidades caninas foram selecionadas pelo ser humano de forma a originar raças especializadas nas mais diversas funções auxiliares. Atualmente, a principal atividade delegada aos cães é a de animal de companhia, e além desta, seu emprego vai desde operações policiais para resolução de crises, até a terapia para pessoas doentes (Anderline & Anderline, 2007; Do Valle, 2009). Já existem cerca de 400 raças de cães reconhecidas por entidades internacionais regulamentadoras, como o *American Kennel Club*, a *Société Central Canine* ou a *Fédération Cynologique Internationale* (Galibert *et al.*, 2011).

O peculiar processo de seleção do cão doméstico levou a grande heterogeneidade morfológica, comportamental e a algumas variações reprodutivas significativas entre

raças. Para fixação de determinadas características desejadas, ainda muito se utiliza de cruzamentos endogâmicos, nos quais se acasalam indivíduos aparentados entre si. Neste processo há tendência de fixação aleatória de alelos, favoráveis ou não, em alguns locos, o que aumenta o aparecimento de genes recessivos (Leppanen *et al.*, 2000; Breda *et al.*, 2004). Por isso, muitas raças caninas possuem alta incidência de problemas ou doenças hereditárias e conformações físicas que podem resultar em inaptidão, redução do bem estar e até dor (Rooney & Sargan, 2008).

O aperfeiçoamento das técnicas de biotecnologia reprodutiva é de grande interesse, devido à possibilidade de seleção e intercâmbio genético entre reprodutores de cada raça que não sejam aparentados, diminuindo a incidência de características deletérias. Para o uso bem sucedido de biotecnologias em reprodução no cão, estudos considerando características raciais são necessários, além da propagação deste conhecimento e de novas tecnologias (Swanson & Brown, 2004). Em bovinos, essas técnicas ajudam a reduzir taxas de endogamia, o que é favorável para a viabilidade de raças raras, reduzindo a incidência de genes deletérios, e reduzindo o risco de extinção destas (Breda *et al.*, 2004). A diversidade genética dentro das espécies domésticas está refletida na variedade de tipos e raças que existem e na variação presente dentro de cada uma, sendo que a perda de um único tipo ou raça compromete o acesso a seus genes e combinações genéticas únicas (Egito *et al.*, 2002).

O processo de melhoramento genético no cão difere muito do melhoramento realizado em outras espécies domésticas, principalmente no caso de espécies com potencial de exploração zootécnica, como, por exemplo, bovinos, suínos e caprinos. Nestas espécies, o melhoramento genético das raças leva em consideração a seleção de características reprodutivas e produtivas, que são fatores cruciais para a otimização da eficiência econômica do rebanho (Pereira *et al.*, 2000). Características reprodutivas não são facilmente fixadas, pois possuem baixas estimativas de herdabilidade, são de difícil mensuração e a resposta é obtida após algumas, ou várias, gerações, fatores que dificultam o melhoramento reprodutivo (Shiotsuki *et al.*, 2009).

No campo da pesquisa reprodutiva, o cão doméstico possui grande valor devido à proximidade entre ele e algumas espécies de canídeos silvestres. A conservação da biodiversidade *in situ* representa um grande desafio em função do elevado nível de perturbações antropogênicas nos ecossistemas naturais (Viana & Tabanez, 1996). Os carnívoros, juntamente com os primatas, são as ordens que possuem maior proporção de espécies ameaçadas no Brasil. As principais causas da redução da população de

carnívoros são a grande pressão de caça, devido à predação incidental de animais domésticos e a redução do seu hábitat natural (Chiarello *et al.*, 2010).

Protocolos que permitam a troca de material genético entre populações da mesma espécie representam uma chance de aumentar a variabilidade genética, e, conseqüentemente, reduzir a possibilidade destes animais serem extintos. Mas a pesquisa reprodutiva com animais selvagens é de difícil condução pela dificuldade de se obter amostras, devido ao número reduzido de animais disponíveis e por se tratarem de animais ferais (Csermak Jr, 2011). Técnicas de biotecnologia reprodutiva desenvolvidas para cães podem ser utilizadas como modelo experimental para outras espécies de canídeos selvagens (Farstad, 2000; Goodrowe *et al.*, 2000; Paula, 2011).

Os cães apresentam ciclo reprodutivo com algumas peculiaridades, as quais dificultam o manejo reprodutivo da espécie. Cadelas são monoéstricas e não sazonais, com exceção da raça Basenji, na qual as fêmeas apresentam estro apenas no outono (Farstad, 2000). As cadelas possuem ciclo longo, que se caracteriza por um longo período de anestro, que dura cerca de cinco meses. O ciclo se repete a cada 6-7 meses na maioria das fêmeas, havendo exceções de intervalo entre estros (Concannon *et al.*, 1989; Martins, 2003). Os ovócitos, na cadela, são liberados num estado ainda imaturo (ovócito primário), por isso não podem ser fertilizados de imediato, levam em média 48 horas para maturarem e permanecem viáveis na tuba uterina por dois a cinco dias (Phemister *et al.*, 1973; Farstad, 2000; Martins, 2003). A detecção do momento ideal para a inseminação pode ser feita por vários parâmetros morfológicos, comportamentais e principalmente fisiológicos como a concentração da progesterona sérica e a colpocitologia vaginal (Concannon *et al.*, 1989; Thomassen *et al.*, 2006).

Os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos de mamíferos por meio de um processo complexo e extremamente regulado, denominado espermatogênese. Ao fim deste processo, eles são liberados no lúmen dos túbulos, e, apesar de já conterem toda maquinaria necessária, ainda não estão aptos a fecundar um ovócito (Sirivaidyapong *et al.*, 2001; Marengo, 2007; Mendonça, 2010). Para isso eles precisam passar pelo processo de maturação, que ocorre durante seu transporte e armazenamento pelo epidídimo (Orgebin-Crist, 1969). No cão, os espermatozoides levam cerca de 62 dias desde o início do processo até sua completa maturação (Ettinger & Feldman, 2010).

O epidídimo é dividido em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. Todas essas áreas fornecem suporte aos espermatozoides e removem células degeneradas. Além

disso, cada uma possui funções específicas no processo de maturação e armazenamento (Chandler *et al.*, 1981; Marengo, 2007). O segmento inicial concentra o sêmen; na cabeça, no corpo e na cauda ocorre a maturação funcional dos espermatozoides, sendo que, na última, eles passam mais tempo e sofrem a maturação final. Por fim, são armazenados na cauda em quiescência até a próxima ejaculação, para que não desperdicem energia (Marengo, 2007).

Durante a maturação, algumas proteínas oriundas do epitélio do epidídimo se ligam à membrana plasmática dos espermatozoides para exercer funções nos órgãos genitais da fêmea (Marengo, 2007; Souza, 2007). Algumas delas se ligam a proteínas e receptores de membrana, mudando sua conformação e sensibilidade a fatores indutores da reação acrossômica (Sirivaidyapong *et al.*, 2001; Marengo, 2007). Apesar de estarem móveis e maduros quando são liberados da uretra, os espermatozoides estão incapazes de fecundar o ovócito (Hewitt & England, 1998; Breitbart, 2002). Para tal, eles precisam passar por um processo denominado capacitação, que os tornará aptos a sofrer reação acrossômica e se ligar à zona pelúcida do gameta feminino (Gadella, 2008). Ainda não se sabe definir o momento marco para identificar o início deste processo (Breitbart, 2002), mas sabe-se que os fluidos folicular e da tuba uterina possuem grande influência na indução da capacitação quando os espermatozoides entram em contato com as secreções genitais femininas (Yanagimachi, 1969). Inicialmente ocorre aumento intracelular de íons cálcio, bicarbonato e peróxido de hidrogênio nos espermatozoides, o que ativa a produção de AMPc (Witte & Schäfer-Somi, 2007). Ocorrem alterações na conformação das membranas plasmática, na região da cabeça dos espermatozoides, e acrossomal, a fluidez da membrana aumenta, bem como sua permeabilidade, há efluxo de colesterol e fosforilação da proteína tirosina (Yanagimachi, 1969; Breitbart, 2002). Quando sofrem capacitação, o padrão de motilidade é alterado, na forma de aumento na taxa de batimento dos flagelos, fenômeno designado hiperativação (Yanagimachi, 1969; Ponglowhapan *et al.*, 2004).

Após capacitado, o espermatozoide está apto a realizar a reação acrossomal que é extremamente regulada e dependente dos eventos que ocorrem na capacitação (Breitbart, 2002; Witte & Schäfer-Somi, 2007). O acrossomo é um grande grânulo que recobre o núcleo do espermatozoide maduro, contendo enzimas hidrolíticas. Após a ligação com a zona pelúcida, a membrana externa do acrossoma se funde à membrana plasmática, liberando o conteúdo de forma irreversível (Breitbart, 2002; De Blas *et al.*, 2005; Witte & Schäfer-Somi, 2007; Costa *et al.*, 2010). Espermatozoides capacitados de

cão *in vitro* são induzidos a sofrer reação acrossomal quando incubados com proteínas da zona pelúcida e com progesterona (Brewis *et al.*, 2001).

Nas membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides de algumas espécies de mamíferos, foi identificado um complexo proteico denominado SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fator), o qual faz parte do processo de fusão de membranas que resulta na exocitose de células secretoras em geral (De Blas *et al.*, 2005; Gadella, 2008). Para realizar a fusão de membranas, o SNARE passa por reorganização conformacional e estrutural que desencadeará a exocitose do conteúdo acrossômico, sendo que o influxo de cálcio para a cabeça do espermatozoide é fator essencial para ativação deste complexo (De Blas *et al.*, 2005). Portanto, a reação acrossomal é um evento secretório dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Spungin & Breitbart, 1996; Brewis *et al.*, 2001; Breitbart, 2002; Witte & Schäfer-Somi, 2007), e, fisiologicamente, é iniciado pelo contato de um receptor de membrana do espermatozoide com a ZP3, um agonista estimulante presente na zona pelúcida do ovócito (Florman, 1994; Witte & Schäfer-Somi, 2007).

Uma cascata de eventos promove o aumento da concentração de cálcio no citosol dos espermatozoides, após a ligação com a zona pelúcida. Inicialmente ocorre a abertura de canais catiônicos pouco seletivos, o que despolariza a membrana e aumenta o pH intracelular, isso estimula a abertura de canais de cálcio, voltagem-sensíveis, além de promover a mobilização de estoques intracelulares de cálcio, os quais podem ser detectados no acrossoma e mitocôndrias (Breitbart, 2002; Witte & Schäfer-Somi, 2007). Existem bombas de cálcio ATP dependentes nas membranas plasmática e acrossomal com função de trocar  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , para retirar cálcio do citosol. Quando o espermatozoide sofre capacitação, essas bombas são ativadas e promovem a redução da concentração citoplasmática de cálcio e aumento do cálcio na vesícula acrossomal e líquido extracelular (Breitbart, 2002). Quando estimulado pela zona pelúcida, há mobilização dos reservatórios de cálcio intracelulares e um canal de cálcio presente na membrana externa do acrossoma é ativado e transfere parte destes cátions para o citosol (Witte & Schäfer-Somi, 2007).

Os processos descritos anteriormente foram observados na maioria das espécies de mamíferos já estudadas, mas poucos testes foram realizados com espermatozoides de cão. Brewis *et al.* (2001) descrevem que o cálcio possui um papel diferente na estimulação da reação acrossomal no espermatozoide canino. Aparentemente ele não

possui reservas intracelulares de cálcio significativas, diferentemente de espermatozoides humanos.

A inseminação artificial utilizando sêmen fresco ou resfriado é amplamente utilizada na reprodução canina e, uma vez comparada à monta natural, tem por vantagens evitar o transporte de animais, e todo o risco e dispêndio inerente a isso, além de minimizar o risco de transmissão de doenças venéreas (Villaverde, 2007). Além disso, possibilita a reprodução de animais com dificuldade em realizar o coito, devido a problemas anatômicos ou comportamentais e características raciais. Porém, os resultados de gestações oriundas de inseminações com sêmen descongelado não são satisfatórios (Farstad, 1984; Linde-Forsberg & Forsberg, 1989; Linde-Forsberg & Forsberg, 1993; Silva, 1995; Silva *et al.*, 1996). Rota *et al.* (1998) obtiveram boa taxa de concepção (84%) em cadelas inseminadas com sêmen descongelado, mas o número de filhotes foi reduzido quando comparado com cadelas submetidas à monta natural. Espermatozoides frescos de cão permanecem viáveis no trato reprodutivo da cadela por cerca de seis dias, já espermatozoides descongelados possuem viabilidade reduzida, por isso os resultados de IA utilizando sêmen descongelado são inferiores (Watson, 2000; Mendonça, 2010). Tsutsui *et al.* (1989) mostraram que os espermatozoides caninos frescos podem chegar à tuba uterina 2 minutos após serem depositados na vagina.

Apesar dos bons resultados observados em IA com sêmen fresco e resfriado, estas opções nem sempre são viáveis devido ao curto tempo de conservação. Foi relatado que o sêmen diluído e resfriado a temperatura próxima a 5°C perde a capacidade fertilizante após 72 horas (Gúnzel & Krause, 1986; Messias, 2000) e o sêmen fresco diluído mantido à temperatura ambiente pode apresentar motilidade progressiva por no máximo 32 horas (Bartlett, 1962). O sêmen congelado pode ser armazenado por período de tempo indeterminado e transportado com segurança, se armazenado de forma adequada, deste modo pode-se prolongar o potencial reprodutivo de machos (Messias, 2000; Silva *et al.*, 2005). Em alguns países, nos quais a entrada de animais é extremamente restrita, a importação do sêmen para IA pode ser uma alternativa para contornar estas limitações (Johnston *et al.*, 2001; Kutzler, 2005).

Os espermatozoides estão predispostos, desde o momento da coleta, a um importante processo estressante que é o choque térmico (Watson, 2000). Ele induz alterações na membrana celular, que levam a desestabilização de proteínas e lipídeos, que podem acarretar alteração no fluxo de íons (Schackmann *et al.*, 1981; Breitbart & Spungin, 1997). A manutenção do sêmen em baixas temperaturas reduz a taxa

metabólica espermática, aumentando a longevidade das células (Linde-Forsberg, 1995). Porém, o processo de congelamento inclui várias etapas críticas que são danosas para os espermatozoides, causando lesões celulares e danos funcionais, muitas vezes irreversíveis (Oettlé, 1986).

Danos inerentes ao congelamento e descongelamento podem ocorrer devido à formação e dissolução de cristais de gelo nos meios extracelular e intracelular. Isso significa que o congelamento rápido do espermatozoide não permite grandes alterações no volume de água intracelular, o que possibilita a formação de cristais de gelo, os quais podem causar danos à membrana celular (Cunha, 2002). Por outro lado, protocolos de congelamento lento promovem o congelamento progressivo da água do líquido extracelular, o que aumenta provisoriamente a concentração de solutos. Durante certo período o meio extracelular fica hipertônico, o que pode causar desidratação celular por osmose, com efeitos deletérios graves, fenômeno conhecido como “efeito soluto” (Amman & Pickett, 1987).

A adição de crioprotetores ao meio de congelamento, a exemplo do glicerol, permite a estabilização dos dois principais efeitos deletérios deste processo: a formação de cristais lesivos e o efeito soluto. Entretanto podem causar alterações osmóticas desfavoráveis e possuem potencial tóxico devido à capacidade de atravessar membranas celulares (McLaughlin, 1992; Gao *et al.*, 1993). Os danos causados aos espermatozoides durante o congelamento, como a redução da motilidade e as lesões de membranas citoplasmática e acrossomal, provocam redução na capacidade de atravessar a zona pelúcida (Messias, 2000). O sêmen canino apresenta correlação positiva entre fertilidade e integridade acrossomal, o que reflete uma qualidade decrescente em amostras frescas, diluídas e descongeladas (Froman *et al.*, 1984).

Neste sentido, os meios diluentes utilizados para a congelamento de sêmen devem apresentar características de proteção à motilidade e à fertilidade dos espermatozoides durante o período de estocagem, prover substrato energético e prevenir efeitos deletérios de mudanças no pH e osmolaridade (Chirinéa *et al.*, 2006). O meio que apresenta melhores resultados para a conservação de sêmen de cão doméstico é o Tris-Citrato acrescido de gema de ovo e glicerol (Rodrigues & Rodrigues, 1998; Rota, 1998; Messias, 2000; Bueno *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2002; Silva, 2007).

O tris (Tris-hidroximetil-aminometano) atua como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (McPhail & Goodman, 1984). Ele remove os íons  $H^+$  produzidos pelo metabolismo dos espermatozoides, evitando que o meio fique ácido e inadequado para a

viabilidade das células, e reduz o metabolismo de frutose pelos espermatozoides, preservando sua energia (Rodrigues, 1997; Silva, 2007). O ácido cítrico é um ácido inorgânico fraco que contribui para a preservação do espermatozoide, atuando como tampão, como antioxidante e no mecanismo de respiração celular (Silva, 2005).

A gema de ovo é amplamente utilizada como agente estabilizador da membrana plasmática, protegendo-a contra o choque térmico (Watson, 1990; Holt, 2000; Luvoni *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2005). Meios contendo gema de ovo preservam a qualidade espermática provavelmente devido à sua ação coloidal no meio e a uma lipoproteína de baixa densidade (LDP), componente da gema, que adere às membranas celulares durante todo o processamento, o mecanismo exato desta ação ainda não foi elucidado (Watson, 1979; Iguer-Ouada & Versteegen, 2001; Silva, 2007). Os detergentes à base de SDS (dodecil sulfato de sódio), Equex STM Paste<sup>®</sup> e Orvus ES Paste<sup>®</sup>, são utilizados com resultados positivos, acredita-se que dissolvam as lipoproteínas da gema de ovo, aumentando seu potencial de penetração na membrana plasmática e, conseqüentemente, sua ação crioprotetora, mas o mecanismo de ação desta substância não está esclarecido (Holt, 2000; Peña *et al.*, 2003).

Nos órgãos genitais femininos alterações espermáticas oriundas do processo fisiológico de capacitação são essenciais para que ocorra a fertilização dos ovócitos, porém, a ocorrência de reação acrossômica (RA) anterior ao contato com a zona pelúcida é prejudicial. Ou seja, as alterações decorrentes da RA precoce inviabilizam o espermatozoide de fertilizar o ovócito, embora ele ainda possa estar móvel, apresentar alto índice de atividade mitocondrial e ser capaz de se ligar à zona pelúcida (Oettlé, 1986; Rota, 1998; Eilts, 2005; Cunha & Lopes, 2005).

Espermatozoides descongelados apresentam grandes índices de lesões acrossomais, que se assemelham ao processo de reação do acrossoma (Mahi & Yanagimachi, 1978). A criopreservação do sêmen estimula a capacitação prematura dos espermatozoides e facilita a ocorrência da reação acrossomal (Cormier & Bailey, 2003). Embora o mecanismo que leve a esta criocapacitação espermática não seja bem elucidado, os processos de resfriamento e, em maior escala, congelamento, promovem alterações na fluidez e na seletividade da membrana plasmática, e também diminuem a taxa de metabolismo celular bem como a capacidade de regular a entrada e saída de íons de cálcio, fatores desencadeadores da RA (MacLaughlin *et al.*, 1994; Bailey *et al.*, 2000; Szász *et al.*, 2000). Rota *et al.* (1998) avaliaram a integridade acrossômica após

criopreservação e notaram que cerca de 45% dos espermatozoides possuíam algum tipo de alteração secundária, representando diferentes estágios de lesão acrossomal.

Sabe-se que o cálcio é um dos principais moduladores dos processos de capacitação e reação acrossomal que ocorrem fisiologicamente. Existem indícios de envolvimento significativo do influxo de cálcio e da mobilização de reservatórios extra e intracelulares também na criocapacitação e RA prematura (Hewitt & England, 1998; Szász *et al.*, 2000; Alhaider & Watson, 2009). Frações de ejaculados de cães foram testadas por Szász (1997), submetendo-as a diferentes concentrações de íons cálcio no meio e utilizando cálcio ionóforo. Concentrações de cálcio extracelular acima de 100 $\mu$ M/L apresentaram significativo aumento de ocorrência de reação acrossomal quando comparadas às amostras tratadas com 50  $\mu$ M/L (Szász *et al.*, 1997). Hewitt & England (1998) obtiveram maior incidência de espermatozoides capacitados e com perda do acrossoma em amostras incubadas com cálcio ionóforo, quando comparadas com amostras mantidas nas mesmas condições sem o cálcio ionóforo. Apesar disso, existem relatos de que, ao contrário de outras espécies, os espermatozoides de cães a fresco podem sobreviver longos períodos com altas concentrações de cálcio no citosol (Alhaider & Watson, 2009).

Uma opção para reduzir a incidência precoce de RA em espermatozoides criopreservados é reduzir a disponibilidade de cálcio ionizado no meio de diluição, o que pode ser alcançado adicionando uma substância quelante de cálcio no meio de congelamento. Alguns testes foram conduzidos com o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) exercendo esta função no congelamento de sêmen caprino, ovino, bovino e bubalino (Lee *et al.*, 1996; Aisen *et al.*, 2000; Cunha & Lopes, 2005; Bittencourt *et al.*, 2008). O EDTA incorpora o cálcio por meio das ligações bivalentes do oxigênio existentes em sua estrutura, fechando-o numa cadeia heterocíclica, esta reação é do tipo quelação, sendo o quelato de cálcio o produto resultante. Nesse sentido, o EDTA indisponibiliza o cálcio no meio extracelular, diminuindo seu influxo para o citosol, o que minimiza a incidência de reação acrossomal prematura (Amann & Pickett, 1987). Aisen *et al.* (2000) obtiveram maiores porcentagens de espermatozoides de carneiro com acrossoma íntegro pós descongelamento em meio contendo EDTA, porém também observaram queda significativa na motilidade quando essa substância foi adicionada sem o uso do dissacarídeo trealose.

O ejaculado é composto por espermatozoides e plasma seminal, o qual, em cães, caracteriza-se por secreções dos ductos ejaculatórios e da próstata, única glândula

sexual acessória considerável nesta espécie (Souza, 2007; Cunha, 2008). O cão ejacula em três frações, sendo a segunda rica em espermatozoides e as demais compostas por líquido prostático. Existem suposições de que a primeira fração tenha função de limpar a uretra para a passagem dos espermatozoides, e a terceira de empurrar a fração rica em espermatozoides através da cérvix (England, 1992). Estudos avaliando os componentes do plasma seminal demonstraram que ele possui diversos fatores relacionados à inibição da capacitação, conhecidos como fatores de decapacitação (Souza, 2007). Também possui substâncias chamadas marcadores seminais, as quais podem predizer a fertilidade dos animais e indicar a origem de frações do ejaculado (Souza, 2010).

A função destas secreções no processo de fertilização ainda é discutida. Estudos questionam sua necessidade no processo de fertilização, pois em todas as espécies testadas, os espermatozoides do epidídimo são capazes de fertilizar o ovócito, ou seja, sem contato com o produto de secreção destas glândulas (Garner & Hafez, 2004). Algumas pesquisas mostraram que o fluido seminal de cão pode apresentar efeito deletério aos espermatozoides quando incubados juntos (England & Allen, 1990; England, 1992), porém, adicionando fluido prostático ao sêmen descongelado, observou-se melhores taxas de fertilidade que no sêmen diluído em TALP (Nöthling *et al.*, 2005).

De acordo com Wales & White (1965) e James *et al.* (1979) o sódio é o cátion mais abundante em todas as três frações do sêmen de cão. Ele geralmente ocorre em associação com o cloreto, sendo que a concentração de cloreto de sódio é semelhante à da solução salina. O potássio é o segundo cátion mais abundante e possui menor concentração no fluido prostático que na fração rica em espermatozoides (Wales & White, 1965). Van Gestel *et al.* (2007) identificaram um suposto canal de  $K^+$  no complexo da região de ligação com a ZP, na cabeça do espermatozoide, o qual pode estar envolvido no influxo de cálcio. Este cátion é descrito como provável auxiliar da ligação da cabeça do espermatozoide com a zona pelúcida (Mahi & Yanagimachi, 1978). No segmento inicial do epidídimo há reabsorção de água secundariamente à reabsorção ativa de íons potássio (Marengo, 2007).

O cálcio, conhecidamente regulador de processos fisiológicos, é um elemento essencial em todas as células vivas, inclusive nos espermatozoides (Wong *et al.*, 2001). Como dito anteriormente ele possui papel crucial na reação acrossômica e parece influenciar na motilidade espermática, a depender da sua fase de maturação. Porém, estudos com sêmen humano apontam resultados controversos relacionados à

concentração de cálcio extracelular e motilidade espermática (Morton *et al.*, 1978; Hong *et al.*, 1984; Prien *et al.*, 1990; Wong *et al.*, 2001). Foi registrada quantidade significativa de cálcio na próstata, glândula vesicular e epidídimos humanos (Wong *et al.*, 2001). A mobilização das reservas intracelulares de cálcio aumenta a concentração dessa substância no citosol e pode induzir reação acrossômica tanto em espermatozoides capacitados quanto em não capacitados, mas, para tal se faz necessária a presença de  $\text{Ca}^{2+}$  também no meio extracelular (Publicover & Barratt, 1999).

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima de desfosforilação com atividade em vários tecidos: ossos, fígado, rins, intestinos, pulmões e placenta (Turner & McDonnell, 2003). Além disso, é encontrada nos órgãos reprodutivos de mamíferos e acredita-se que ela possua função em reações glicolíticas e produção de frutose nos espermatozoides (Turner & McDonnell, 2003). Ela pode ser utilizada como um indicador que o fluido epididimário está presente na amostra, ou seja, a principal fonte de FA, em todo o aparelho reprodutor masculino do cão, é a cauda do epidídimo (Frenette *et al.*, 1986). Em amostras de sêmen de cães, as maiores concentrações de FA estão associadas à fração rica em espermatozoides, enquanto a secreção de origem prostática apresenta concentração baixa (Johnson, 2010). Azoospermia associada à baixa concentração da FA pode indicar uma obstrução bilateral distal aos epidídimos, ou que a ejaculação pode ter sido incompleta. Enquanto azoospermia associada a uma elevada atividade da FA indica falha na produção espermática ou obstrução bilateral na rede testicular (Johnson, 2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Mensurar a composição dos principais cátions (sódio, potássio e cálcio) e da enzima fosfatase alcalina em diferentes frações do sêmen de cães. Avaliar o efeito do EDTA, como quelante de cálcio, quando adicionado ao meio de congelamento de sêmen.

#### **3.2 Objetivos específicos**

-Estabelecer as concentrações médias dos cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , e  $\text{Ca}^{2+}$  e da enzima fosfatase alcalina, no plasma seminal nas diferentes frações do ejaculado canino.

- Quantificar, a partir do uso de sondas fluorescentes, os efeitos deletérios do congelamento sobre as membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides.
- Verificar a eficiência do efeito quelante de diferentes concentrações de EDTA sobre a concentração de cálcio no meio de congelamento.
- Avaliar se a ocorrência de lesões acrossomais em espermatozoides de cão pode ser reduzida quando a concentração de cálcio no meio extracelular diminui.
- Verificar a existência de efeito deletério do EDTA sobre os espermatozoides.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais e coletas**

Foram utilizados três cães machos adultos, sem raça definida, oriundos do canil municipal de Viçosa. Obteve-se um total de dez coletas, sendo três em dois animais e quatro em um. Utilizou-se um período de descanso entre dois e cinco dias entre coletas para cada cão. O sêmen foi coletado por estimulação manual do pênis, em tubo plástico com base cônica de 15 mL, graduado e transparente (*falcon*®), este era mantido em banho-maria em recipiente de plástico transparente contendo água a 38°C, acoplado a um funil de plástico.

A primeira e a segunda frações do sêmen foram coletadas juntas, correspondendo à fração rica em espermatozoides (FR). Padronizou-se o volume coletado desta fração a um volume máximo de 2,5 mL. Após o descarte do excedente da FR, a terceira fração, ou fração prostática (FP), foi coletada separadamente e reservada. Após a coleta, a fração rica em espermatozoides foi mantida em banho-maria a 37°C durante todo o processamento.

### **4.2 Padronização da concentração e avaliação do sêmen fresco**

Imediatamente após a coleta, retirou-se 50µL da fração rica em espermatozoides para diluição em um tubo plástico de 1,5mL (*ependorf*®) contendo 200µL de solução fixadora *karnovsky* (paraformaldeído 4% adicionado de glutaraldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4), aquecido a 37°C, para avaliação da morfologia espermática. Para tal, foram contabilizadas 100 células, em aumento de 1000X, em microscópio de contraste de fase, e classificadas, de acordo com as alterações morfológicas

preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), em defeitos maiores e menores.

Em seguida, 1mL de FR foi diluído em 1mL de meio de manutenção composto por tris, ácido cítrico, glicose, gema de ovo e amicacina (Anexo I). Uma alíquota de 8 $\mu$ L do sêmen diluído foi destinada à análise de vigor e motilidade espermática, em uma lâmina sobreposta por lamínula, em microscópio de luz em aumento de 400X. O vigor foi classificado em uma escala de 0 a 5, sendo 0 imobilidade e 5 maior intensidade de movimento. A motilidade foi estimada a partir do percentual de espermatozoides móveis.

Uma alíquota de 5 $\mu$ L foi novamente diluída em tubo plástico de 1,5mL (*eppendorf*®) contendo 495 $\mu$ L de água destilada na proporção 1:100 e, após homogeneização, utilizou-se uma câmara de *Neubauer* para o cálculo da concentração espermática. Após aferida a concentração, padronizou-se a amostra para 100 x 10<sup>6</sup> espermatozoides móveis/mL por diluição em meio Tris-citrato-gema de ovo, para tal considerou-se, para o cálculo final da concentração, o percentual de motilidade espermática registrada para a amostra.

Para o teste hiposmótico (HOST), retirou-se 20 $\mu$ L do sêmen diluído, que foi adicionado a um tubo plástico de 1,5mL (*eppendorf*®) contendo 250 $\mu$ L de solução de sacarose, a 150 mOsmol./kg (Cunha, 2008). Essa solução foi incubada por 30 minutos a 37°C e posteriormente fixada com 50  $\mu$ L de solução *karnovsky* para posterior avaliação em microscópio de contraste de fase. No teste hiposmótico, foram contados 100 espermatozoides, classificados em duas populações: cauda alterada (englobando caudas enroladas, dobradas, fortemente enroladas e fortemente dobradas) e cauda normal, indicando membrana plasmática íntegra ou lesada, respectivamente (Kumi-diaka, 1993). O resultado final foi subtraído do número de espermatozoides com caudas alteradas patológicas, obtido pela avaliação da morfologia.

### **4.3 Congelamento e avaliação do sêmen descongelado**

Para cada ejaculado, o sêmen previamente padronizado para a concentração de 100 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, a partir de diluição em meio de manutenção, foi dividido em três tratamentos. Assim, alíquotas foram diluídas a volumes iguais (1:1 v/v) do meio base de congelamento, composto por Tris Citrato, gema de ovo 20%, glicerol 12% e Equex (STM Paste®) a 1%, sendo que ao tratamento 2 foi acrescido 0,2% e ao

tratamento 3, 0,5% de EDTA (Sigma, E6511) como descrito no Anexo I, correspondendo, deste modo, a concentrações finais de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL e:

- Tratamento 1: Tris-citrato-gema de ovo, 6% de glicerol e 0,5% de Equex;
- Tratamento 2: Tris-citrato-gema de ovo, 6% de glicerol e 0,5% de Equex, 0,1% EDTA;
- Tratamento 3: Tris-citrato-gema de ovo, 6% de glicerol e 0,5% de Equex a 0,25% EDTA.

O sêmen diluído de cada tratamento foi envasado em palhetas francesas de 0,25mL, identificadas de acordo com o animal, data e concentração de EDTA. As palhetas foram submetidas a uma taxa de resfriamento que atinge 4°C após uma hora. Para isto, as palhetas foram acondicionadas em tubo de ensaio rosqueado, imerso em um frasco de vidro com 500 ml de água a 37°C, envolto por gelo e água na altura de 13 cm, dentro de caixa isotérmica fechada. Após esta etapa, a temperatura foi mantida a 4°C por mais uma hora, denominado tempo de equilíbrio. Após o tempo de equilíbrio, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido. Para tal, foi utilizado um suporte para a manutenção das palhetas a uma altura de 10 cm, sobre uma lâmina de 3cm de nitrogênio líquido em caixa isotérmica por 15 minutos. Em seguida, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido e estocadas em botijão de criopreservação (Deco-Souza *et al.*, 2013).

Após uma semana, as amostras foram descongeladas por imersão em água a 37°C, durante 7 segundos e acondicionadas em tubo plástico de 1,5mL (*ependorf*®), em banho-maria também a 37°C. As amostras de cada tratamento foram avaliadas quanto ao vigor, motilidade, morfologia espermática e ao número de células reativas ao teste hiposmótico, seguindo os procedimentos realizados para avaliação do sêmen fresco.

#### **4.4 Teste de integridade de membrana plasmática e acrossomal**

Para o teste de integridade de membrana plasmática e acrossomal utilizou-se coloração com sondas fluorescentes. As sondas utilizadas foram: Hoechst 33342 (Molecular Probes H1399: 100mg) indicando membrana plasmática íntegra, Iodeto de Propídio (Sigma P4170) como indicador de membrana plasmática lesada e Fit-C PSA (Sigma L0770) indicando membrana acrossomal lesada.

Para determinação de integridade da membrana plasmática e membrana acrossômica adaptou-se o protocolo de Csermak Jr (2011). Em um tubo plástico âmbar

de 1,5mL (*ependorf*®) adicionou-se 80 µL de sêmen descongelado, 200 µL de Hoescht e após 10 minutos de incubação a 37°C adicionou-se 2 µL de Iodeto de Propídio e 100 µL de Fit-C PSA (Anexo II). Após 3 minutos de incubação a 37°C montou-se a lâmina com uma gota do sêmen corado sob lamínula e avaliou-se imediatamente em microscópio de epifluorescência equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm) no aumento de 1000 vezes. Contou-se 100 células em cada tratamento, as quais foram divididas em quatro populações: membranas plasmática e acrossomal íntegras (II), membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (IL), membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (LI) e membranas plasmática e acrossomal lesadas (LL) (Tabela 1).

Tabela 1 - Populações de espermatozoides identificadas pela associação das sondas Hoescht, IP e FitC - PSA

Populações	Hoescht	IP	FitC
<i>Membrana plasmática e membrana acrossomal íntegras (II)</i>	+	-	-
<i>Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada (IL)</i>	+	-	+
<i>Membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (LI)</i>	-	+	-
<i>Membrana plasmática lesada membrana acrossomal lesada (LL)</i>	-	+	+

Hoescht: Hoescht 33342; IP: Iodeto de propídeo; FitC: Isotiocianato de fluoresceína conjugado *Pisum sativum* (adaptado de Csermak Jr, 2011)

#### 4.5. Teste de termorresistência

Após o descongelamento, uma alíquota do sêmen foi colocada em tubo plástico de 1,5mL (*ependorf*®) e mantida em banho-maria a 37°C por duas horas, para realização do teste de termorresistência. Em intervalos de 15 minutos a amostra era homogeneizada e dela retirada uma alíquota de 10µL e colocada em lâmina sob lamínula para análise do vigor e da motilidade espermática em microscópio de luz em aumento de 400X.

#### 4.6 Mensuração da composição bioquímica

Imediatamente após cada coleta de sêmen, amostras da fração rica em espermatozoides (FR) e da fração prostática (FP) foram encaminhadas ao Laboratório Clínico do Departamento de Veterinária da UFV para mensuração das concentrações de Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e fosfatase alcalina. Para tal foi retirada uma alíquota da FP, precedida de

homogeneização, e a FR foi centrifugada a 2400 RPM por 10 minutos, sendo utilizada uma alíquota do sobrenadante.

O cálcio foi mensurado por equipamento de espectrofotometria E-225D (Celm<sup>®</sup>) a 370 nanômetros, utilizando o reagente de cálcio InVitro<sup>®</sup>. O sódio e o potássio mensurados em um espectrofotômetro de chama B462 (Micronal<sup>®</sup>). A fosfatase alcalina foi mensurada pelo analisador semiautomático de parâmetros bioquímicos BIO-300 (BioClin<sup>®</sup>), utilizando o kit InVitro<sup>®</sup>. Devido à elevada concentração desta enzima no sêmen, a amostra foi pré-diluída a 1:100 em solução salina 0,9% para a aferição.

#### **4.7 Análise estatística**

Utilizou-se o teste de Lillifors para verificar distribuição normal ou não das variáveis. A homogeneidade das variâncias foi avaliada por meio do teste de Cochran e Bartlett. Para as variáveis que preencheram as premissas para avaliação paramétrica, foi utilizado o teste Duncan a 5% de significância para a comparação das médias entre os tratamentos do sêmen descongelado ou entre os três animais. Para comparação entre dois tratamentos (FR e FP) utilizou-se o teste F. Os dados que não atenderam às premissas de normalidade e/ou homogeneidade foram avaliados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon ou Kruskal Wallis a 5% de significância, a depender do número de tratamentos testados. As análises foram realizadas utilizando o software SAEG 9.1 (2007).

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para os parâmetros vigor, motilidade, morfologia espermática e teste hiposmótico, obtidos no sêmen fresco dos três cães, utilizou-se as médias individuais para calcular uma média geral destes animais como caracterização do sêmen fresco do grupo utilizado neste experimento (tabela 2). Apesar de detectada diferença entre animais ( $p < 0,05$ ), foi utilizada média geral para comparação dos parâmetros avaliados a fresco e após o descongelamento do sêmen. Muitos trabalhos que avaliam a qualidade seminal da espécie canina utilizam o agrupamento de sêmen de diferentes animais, em *pools*, de forma a padronizar variações individuais (Rota *et al.*, 1995; Peña *et al.*, 1998; Peña e Lind-Foresberg, 2000; Santos *et al.*, 2003; Martins-Bessa *et al.*, 2006).

Tabela 2: Vigor, Motilidade, Morfologia espermática e Teste hiposmótico do sêmen fresco de cão.

	Cão 1	Cão 2	Cão 3	Geral
Vigor* (1-5)	4,5 ± 0 <sup>a</sup>	4 ± 0,5 <sup>ab</sup>	3,33 ± 0,29 <sup>b</sup>	4 ± 0,58
Motilidade** (%)	95 ± 0 <sup>a</sup>	88,33 ± 2,89 <sup>b</sup>	86,67 ± 5,77 <sup>b</sup>	90,5 ± 4,97
Patologia** (% anormais)	30 ± 7,83 <sup>ab</sup>	44,33 ± 7,23 <sup>a</sup>	21,33 ± 9,5 <sup>b</sup>	31,7 ± 11,94
Defeitos maiores** (%)	5,5 ± 4,2 <sup>ab</sup>	12,33 ± 6,66 <sup>a</sup>	0,67 ± 1,15 <sup>b</sup>	6,1 ± 6,24
Defeitos menores** (%)	42,5 ± 10,6	32 ± 6,08	20,67 ± 10,5	25,6 ± 9,62
Hiposmótico** (% reativas)	68,75 ± 8,46 <sup>a</sup>	51,7 ± 8,96 <sup>b</sup>	77,33 ± 10,26 <sup>a</sup>	68,5 ± 16,19

Valores referentes às médias ± desvio padrões.

\* Médias seguidas por letras subscritas diferentes na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste Kruskal-wallis

\*\* Médias seguidas por letras subscritas diferentes na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste Duncan

A concentração de alguns cátions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) e da enzima fosfatase alcalina (FA) estão dispostas em médias individuais na tabela 3 para a fração rica em espermatozoides (FR), e tabela 4 para a fração prostática, e uma média geral para cada elemento mensurado, para posterior comparação entre as frações do ejaculado está apresentada na tabela 5. Além disso, foram mensuradas as concentrações dessas substâncias no meio base de congelamento (sem EDTA) para comparação com as médias obtidas nos ejaculados dos cães, os resultados estão expostos na tabela 5.

Os elementos bioquímicos do plasma seminal de cão e suas concentrações normais e patológicas são pouco estudados, alguns deles possuem importância no diagnóstico de patologias do aparelho reprodutor, como por exemplo, a fosfatase alcalina. Considera-se que a fração do ejaculado oriunda do epidídimo contém concentração de FA superior a 5000 UI/L, já nos ejaculados oriundos da próstata deve-se observar valores inferiores (Johnson, 2010; Kustritz, 2010). No presente trabalho, a concentração média de FA na fração rica em espermatozoides, foi marcadamente superior à observada na fração prostática (tabela 5), resultado compatível com o estudo de Frenette *et al.* (1986), que descreveu a presença de alta concentração de FA no fluido oriundo do epidídimo de cães quando comparado com o fluido oriundo da próstata. Na avaliação individual dos animais, foi observado diferença significativa na atividade da

FA do cão 1, apenas nos valores obtidos na FR, sendo esta variação aproximadamente três vezes superior aos demais, indicando influência de fatores individuais na concentração dessa enzima no ejaculado de cães. A média de FA na FP do cão 2 foi maior que a descrita por Johnson, 2010 e Kustritz, 2010, o que indica que ambas as frações do sêmen (rica em espermatozoides e prostática) podem sofrer variações individuais.

A FA pertence a um grupo de enzimas relativamente inespecíficas que catalisam a hidrólise de fosfomonoésteres em pH alcalino, ela possui atividade em vários tecidos de mamíferos, sendo encontrada, principalmente, no fígado e ossos (Motta, 2000). Sabe-se que ela está envolvida na mineralização da matriz óssea e do esmalte dentário, e diretamente relacionada à atividade osteoblástica (Vieira, 1999). Apesar de presente em alta concentração no fluido seminal de mamíferos sua função para a fertilidade é desconhecida e pode estar relacionada a mecanismos de mobilização de cálcio. Neste estudo não observou-se relação entre a concentração desta enzima e qualidade do sêmen para os parâmetros avaliados (vigor, motilidade, morfologia, integridade de membrana plasmática).

Tabela 3: Cálcio, potássio, sódio e fosfatase alcalina na fração rica em espermatozoides (FR).

	Cão 1	Cão 2	Cão 3
Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)	1,38 ± 0,58	1,63 ± 0,74	1,648 ± 0,55
FA*(UI/L)	138.539,33 ± 85.139,41 <sup>a</sup>	59.157,14 ± 7.659,11 <sup>b</sup>	43.955,2 ± 20.208,76 <sup>b</sup>
K <sup>+</sup> (mEq/L)	9,1 ± 1,35	10,45 ± 1,71	7,85 ± 1,79
Na <sup>+</sup> ***(mEq/L)	135,13 ± 5,11 <sup>b</sup>	136,83 ± 3,66 <sup>b</sup>	144,75 ± 4,99 <sup>a</sup>

Ca<sup>2+</sup>: cálcio; FA: fosfatase alcalina; K<sup>+</sup>: potássio; Na<sup>+</sup>: Sódio

Valores referentes às médias ± desvio padrões

\*Médias seguidas por letras subscritas diferentes na mesma linha diferem entre si (p<0,05) pelo teste Kruskal-wallis

\*\*Médias seguidas por letras subscritas diferentes na mesma linha diferem entre si (p<0,05) pelo teste Duncan.

Dentre os eletrólitos presentes no sêmen de cão o cálcio, sódio e potássio são descritos como os mais importantes, estudos identificaram que ambas as frações, rica em espermatozoides e prostática, possuem altas concentrações de sódio e baixas de potássio e cálcio (James *et al.*, 1979; Wales & White, 1965; Quinn *et al.*, 1965). Os valores médios dos animais estudados neste trabalho apresentaram o mesmo padrão da

literatura (tabela 5). Assim, o sódio foi o cátion mais abundante tanto na FR quanto na FP. Na análise individual observou-se diferença significativa apenas para os níveis de  $\text{Na}^+$  na FR do cão 3 em relação aos demais (Tabela 3).

As concentrações médias de cálcio obtidas neste estudo foram superiores às observadas por England *et al.* (1990) e Souza (2003), que obtiveram ejaculados de cães com média de 0,31 mg/dL e 0,8 mg/dL de cálcio respectivamente. Em todos os estudos deste íon no ejaculado canino, sua concentração é muito superior à concentração sanguínea normal da espécie. De acordo com Kiliç *et al.* (1996), o cálcio é secretado principalmente pela próstata em mamíferos, porém neste trabalho as concentrações obtidas de cálcio nos fluidos oriundos do epidídimo e da próstata foram semelhantes. Após deferentectomia Souza (2003), observou maior concentração de cálcio no fluido seminal, fator que provavelmente ocorre pela ausência de espermatozoides para sequestrar os íons livres para o meio intracelular.

Em condições fisiológicas, após a ligação com a zona pelúcida, a membrana externa do acrossoma se funde à membrana plasmática, liberando enzimas hidrolíticas necessárias à penetração espermática, de forma irreversível (Breitbart 2002; De Blas *et al.*, 2005; Witte & Schäfer-Somi, 2007; Costa *et al.* 2010). Esta reação acrossomal (RA) é um evento secretório dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Spungin & Breitbart, 1996; Brewis *et al.*, 2001; Breitbart, 2002; Witte & Schäfer-Somi, 2007), ou seja, o cálcio é um dos principais moduladores dos processos de capacitação e reação acrossomal. Concentrações anormais de cálcio no plasma seminal são encontradas em alguns casos de infertilidade masculina humana (Pandy *et al.*, 1983). Existem indícios de envolvimento significativo do cálcio na RA prematura durante a criopreservação (Hewitt & England, 1998; Szász *et al.*, 2000; Cormier & Bailey, 2003; Alhaider & Watson, 2009). Souza (2003) não observou correlação entre os níveis de cálcio no plasma seminal e os parâmetros motilidade e vigor espermáticos, teste hiposmótico e porcentagem de células íntegras observadas na coloração com sondas fluorescentes. Um fator importante observado neste trabalho foi a alta concentração de cálcio encontrada no meio de congelamento utilizado a base de Tris-citrato-gema de ovo (Tabela 5), concentração cerca de dez vezes maior que a normal no sêmen dos cães.

O valor médio obtido para potássio na fração rica em espermatozoides (FR) dos animais testados neste trabalho foi 9,27 mg/dL pouco menor que o obtido por James *et al.* (1979), England *et al.* (1990), Souza *et al.* (1995) e Souza (2003) 12,1 mEq/L, 10,27 mEq/L, 11,06 mEq/L e 11,76 mEq/L, respectivamente. Souza (2003) obteve correlação

negativa entre os níveis de potássio no plasma seminal e motilidade espermática. Roblero *et al.* (1988) e Kumar *et al.* (2000) relataram aumento da taxa de reação do acrossoma em espermatozoides humanos submetidos a altas concentrações de potássio.

Com relação ao sódio, a concentração média no ejaculado dos cães deste trabalho foi de 137,83 mEq/L, valor superior à média obtida por Bartlett (1962), 113,5 mEq/L, e inferior aos valores obtidos por James *et al.* (1979), England *et al.* (1990), Souza *et al.* (1995) e Souza (2003), que descrevem concentrações de sódio de 141 mEq/L, 143 mEq/L, 145,32 mEq/L e 146,93 mEq/L, respectivamente.

Tabela 4: Cálcio, potássio e sódio e da fosfatase alcalina na fração prostática (FP).

	Cão 1	Cão 2	Cão 3
Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)	1,19 ± 0,9	1,79 ± 0,71	1,176 ± 0,40
FA (UI/L)	3.299,33 ± 556,26	7.292,2 ± 4.125,2	3.729,4 ± 2.576,58
K <sup>+</sup> (mEq/L)	10,9 ± 0,82	8,84 ± 1,99	9,78 ± 1,8
Na <sup>+</sup> (mEq/L)	137,83 ± 6,15	145,6 ± 4,39	141,2 ± 13,26

Ca<sup>2+</sup>: cálcio; FA: fosfatase alcalina; K<sup>+</sup>: potássio; Na<sup>+</sup>: Sódio  
Valores referentes às médias ± desvio padrões.

Tabela 5: Cálcio, potássio, sódio e fosfatase alcalina na fração rica em espermatozoides (FR), fração prostática (FP) de cães e no meio base de congelamento.

	FR	FP	Meio base de congelamento
Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)	1,52 ± 0,62 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,73 <sup>a</sup>	16,352
FA (UI/L) *	81.395,11 ± 65.318,46 <sup>a</sup>	5.000,46 ± 3.379,36 <sup>b</sup>	0
K <sup>+</sup> (mEq/L)	9,27 ± 1,78 <sup>a</sup>	9,91 ± 1,71 <sup>a</sup>	3,9
Na <sup>+</sup> (mEq/L)	137,83 ± 5,84 <sup>a</sup>	141,31 ± 8,69 <sup>a</sup>	23

Ca<sup>2+</sup>: cálcio; FA: fosfatase alcalina; K<sup>+</sup>: potássio; Na<sup>+</sup>: Sódio  
Valores referentes às médias ± desvio padrões.

\*Médias seguidas por letras subscritas diferentes na mesma linha diferem entre si (p<0,05) pelo teste Wilcoxon.

O sêmen de cão é particularmente sensível aos procedimentos de criopreservação, principalmente abaixo de 5°C. No decorrer do processo há uma grande depreciação dos aspectos funcionais dos espermatozoides caninos após o descongelamento, tais como: aumento no número de patologias espermáticas, diminuição do vigor e motilidade

espermáticas, integridade e viabilidade de membranas (Watson, 1981; Alhaider & Watson, 2009; Mascarenhas, 2006). O processo de criopreservação do sêmen promove alterações potencialmente danosas à morfofisiologia celular, sendo as principais: o choque térmico, a formação e dissolução de cristais de gelo e o estresse osmótico (Holt, 2000; Watson, 2000). As alterações vinculadas a estes aspectos, via de regra geram danos estruturais e metabólicos celulares (Bailey *et al.* 2000), os quais se caracterizam por mudanças no estado físico dos lipídios, que alteram a fluidez das membranas (Hammerstedt *et al.*, 1990; Watson, 2000) e também alterações na estrutura de receptores de membrana e canais iônicos, o que reflete na diminuição irreversível da motilidade e da capacidade de ligação dos espermatozoides ao ovócito (Holt, 2000; Bailey *et al.*, 2000).

No presente experimento, após o descongelamento do sêmen criopreservado utilizando-se o meio de congelamento base (Tratamento 1), não foram observadas diferenças significativas entre os valores individuais de vigor, motilidade, morfologia e teste hiposmótico (Tabela 6). Porém, houve uma queda significativa de aspecto qualitativo em todos estes parâmetros comparativamente ao sêmen fresco (Tabela 6).

Na avaliação de integridade de membrana por coloração com sondas fluorescentes, as células marcadas com iodeto de propídeo apresentaram fluorescência vermelha na cabeça, indicando membrana plasmática lesada; as coradas por Hoescht, coloração azul na cabeça, indicando membrana plasmática íntegra e as coradas com FitC-PSA, coloração verde apenas na região correspondente à matriz acrossômica. No primeiro protocolo de coloração com sondas fluorescentes, utilizando-se iodeto de propídeo, Hoescht e Fit-C PSA, assim como descrito por Csermak Junior (2011), Araújo (2012) e Garay (2012), foi possível identificar quatro populações espermáticas: espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras (II), membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (LI), membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (IL) e membrana plasmática e acrossomal lesadas (LL). Avaliar as injúrias causadas às membranas plasmática e acrossomal permite investigar os passos dos protocolos de manipulação, congelamento e descongelamento responsáveis por estes danos. O uso de sondas fluorescentes tem sido largamente utilizado para este fim, uma vez que permitem a avaliação de estruturas e compartimentos específicos das células espermáticas (Peterson *et al.*, 1974; Halangk *et al.*, 1984).

Observou-se alto índice da população LI nos três tratamentos, o que significa alto índice de lesão de membrana plasmática sem lesão de membrana acrossomal.

Associando-se a esta, a população de LL, obtém-se um índice superior a 80% de espermatozoides com lesões de membrana plasmática nos três tratamentos descongelados, assim como observado pelo teste hiposmótico (Tabela 8). De alguma forma este índice de lesão de membrana espermática não configura imobilidade do espermatozoide uma vez que o percentual de motilidade registrado imediatamente após o descongelamento mostrou-se relativamente alto nos três tratamentos. Células pertencentes à população IL (membrana plasmática íntegra e acrossômica lesada) foram raras, o que pode indicar que a reação acrossômica raramente acontece em espermatozoides que não sofreram estímulo ou desestabilização de membrana previamente. O somatório de espermatozoides apresentando lesão de membrana acrossômica (LL e IL), podendo indicar reação acrossomal prematura, não diferiu significativamente entre os tratamentos, possivelmente a quelação de Ca não foi suficiente para evitar o desencadeamento da RA.

Tabela 6: Vigor, motilidade, morfologia espermática e teste hipostmótico com o sêmen descongelado sem adição de EDTA e média geral do sêmen fresco.

	Cão 1	Cão 2	Cão 3	Média Descongelado**	Média Fresco**
Vigor (1-5)	3 ± 0 <sup>a</sup>	2,67 ± 0,29 <sup>a</sup>	2,83 ± 0,29 <sup>a</sup>	2,85 ± 0,24 <sup>a</sup>	4 ± 0,58 <sup>b</sup>
Motilidade (%)	72,5 ± 5 <sup>a</sup>	63,33 ± 5,77 <sup>a</sup>	66,67 ± 5,77 <sup>a</sup>	68 ± 6,32 <sup>a</sup>	90,5 ± 4,97 <sup>b</sup>
Morfologia (% anormais)	66,25 ± 12,58 <sup>a</sup>	75 ± 3,61 <sup>a</sup>	75 ± 8 <sup>a</sup>	71,5 ± 9,50 <sup>a</sup>	31,7 ± 11,94 <sup>b</sup>
Defeitos maiores (%)	32 ± 5,72 <sup>a</sup>	30,33 ± 8,02 <sup>a</sup>	21,33 ± 6,11 <sup>a</sup>	28,3 ± 7,56 <sup>a</sup>	6,1 ± 6,24 <sup>b</sup>
Defeitos menores (%)	34 ± 10,17 <sup>a</sup>	44,67 ± 7,57 <sup>a</sup>	53,67 ± 6,11 <sup>a</sup>	43,1 ± 11,42 <sup>a</sup>	25,6 ± 9,62 <sup>b</sup>
Hiposmótico (% íntegras)	31,5 ± 20,04 <sup>a</sup>	10,33 ± 9,61 <sup>a</sup>	8,33 ± 10,97 <sup>a</sup>	18,20 ± 17,69 <sup>a</sup>	68,5 ± 16,19 <sup>b</sup>
[Ca <sup>2+</sup> ] (mg/dL)*	23,35 ± 1,62 <sup>a</sup>	20,27 ± 0,32 <sup>ab</sup>	19,4 ± 2,6 <sup>b</sup>	21,236 ± 2,41 <sup>a</sup>	1,52 ± 0,62 <sup>b</sup>

Valores referentes às médias ± desvio padrões.

\*Médias seguidas por letras subscritas diferentes na mesma linha diferem entre si (p<0,05) pelo teste Duncan.

\*\*Médias seguidas por letras subscritas diferentes na mesma linha diferem entre si (p<0,05) pelo Teste F.

O mecanismo de homeostase da célula espermática depende da integridade da membrana plasmática (Amann & Pickett, 1987). Assim, células com a membrana danificada tendem a perder funcionalidade e não sobreviverem no trato genital da fêmea (Parks & Graham, 1992). Espermatozoides descongelados apresentam grandes índices de lesões acrossomais, que se assemelham ao processo de reação do acrossoma (Mahi &

Yanagimachi, 1978). Rota *et al.* (1998) avaliou a integridade acrossômica de espermatozoides de cão após criopreservação e notou que cerca de 45% dos espermatozoides possuíam algum tipo de alteração secundária, representando diferentes estágios de lesão acrossomal, valor maior que o encontrado no presente trabalho onde a média de lesão acrossômica ficou em 30, 22 e 27% para os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente. Vale destacar novamente os altos índices de lesões de membrana plasmática nos três tratamentos, sendo provavelmente o principal fator responsável pela queda na qualidade do sêmen pós descongelamento.

Os meios diluentes utilizados para o congelamento de sêmen devem apresentar características de proteção dos espermatozoides na conservação da motilidade e fertilidade por um período de tempo e, ainda, providenciar substrato energético e prevenir efeitos deletérios de mudanças no pH e osmolaridade (Chirinéa *et al.*, 2006). Embora o meio Tris-Citrato acrescido de gema de ovo e glicerol apresente os melhores resultados para a conservação de sêmen de cão (Rodrigues & Rodrigues, 1998; Rota *et al.*, 1998; Messias, 2000; Bueno *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2002; Silva, 2007), este meio possui valores elevados de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Assim, no presente estudo, a concentração de cálcio observada no meio base de congelamento foi cerca de dez vezes mais elevada que a concentração normal deste íon nas frações FR e FP (Tabela 6). Com o intuito de diminuir a concentração de íons cálcio no meio de congelamento, foi utilizado o quelante EDTA nos tratamentos 2 e 3, havendo redução significativa da concentração de cálcio em relação ao meio base de congelamento e mesmo dentre as diferentes concentrações nos tratamentos 2 e 3 (Tabela 7).

Porém, mesmo na concentração mais elevada de EDTA utilizada, Tratamento 3, os níveis de íons  $\text{Ca}^{2+}$  mantiveram-se acima do valor fisiológico observado no sêmen *in natura* dos animais estudados (Tabela 6). Nenhuma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi observada entre os resultados dos testes de qualidade espermática relativos aos três tratamentos (Tabela 7). Dhami *et al.* (1994) e Bittencourt *et al.* (2004) obtiveram aumento significativo na motilidade pós descongelação em amostras de sêmen bovino, bubalino e caprino congeladas com EDTA, porém o sêmen caprino no trabalho de Bittencourt *et al.* (2004) apresentou aumento no índice de alterações morfológicas. Bittencourt *et al.* (2008) encontraram menores índices de lesões morfológicas em amostras congeladas em meio acrescido de 0,1% de EDTA. No presente experimento, os resultados obtidos mostram que o EDTA não possui efeito deletério significativo

para o sêmen de cão ao mesmo tempo que não representa efeito benéfico após o descongelamento, mesmo em concentração acima das testadas em outras espécies.

Tabela 7: Vigor, Motilidade, Morfologia espermática, Hiposmótico e teste de integridade de membranas com sondas fluorescentes para os três tratamentos do sêmen descongelado.

	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
Vigor (1-5)	2,85 ± 0,24 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,21 <sup>a</sup>	2,85 ± 0,42 <sup>a</sup>
Motilidade (%)	68 ± 6,32 <sup>a</sup>	71 ± 8,76 <sup>a</sup>	65,5 ± 6,85 <sup>a</sup>
Morfologia (% anormais)	71,5 ± 9,5 <sup>a</sup>	66,8 ± 5,79 <sup>a</sup>	68,8 ± 8,78 <sup>a</sup>
Defeitos maiores (%)	28,3 ± 7,56 <sup>a</sup>	27,9 ± 9,96 <sup>a</sup>	22,2 ± 8,72 <sup>a</sup>
Defeitos menores (%)	43,1 ± 11,42 <sup>a</sup>	39 ± 5,4 <sup>a</sup>	45,4 ± 8 <sup>a</sup>
Hiposmótico (% íntegras)	18,2 ± 17,69 <sup>a</sup>	25,1 ± 17,91 <sup>a</sup>	21,1 ± 24,35 <sup>a</sup>
LI (%)	54,2 ± 14,05 <sup>a</sup>	63,2 ± 10,58 <sup>a</sup>	58,9 ± 14,39 <sup>a</sup>
II (%)	15,2 ± 9,44 <sup>a</sup>	14,5 ± 6,43 <sup>a</sup>	12,8 ± 8,2 <sup>a</sup>
LL (%)	30 ± 9,78 <sup>a</sup>	22 ± 6,83 <sup>a</sup>	27 ± 11,22 <sup>a</sup>
IL (%)	0,6 ± 1,07 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,48 <sup>a</sup>	0,6 ± 1,58 <sup>a</sup>
Ca <sup>2+</sup> mg/dL*	21,236 ± 2,41 <sup>a</sup>	13,91 ± 1,48 <sup>b</sup>	3,98 ± 1,59 <sup>c</sup>

Valores referentes às médias ± desvio padrões.

\*Médias seguidas por letras subscritas diferentes na mesma linha diferem entre si (p<0,05) pelo teste Duncan.

Szász *et al.* (2000) testaram a capacidade de indução de RA por cálcio ionóforo e integridade acrossomal pós descongelamento e sugeriram que as populações de espermatozoides reagem da mesma forma ao cálcio ionóforo e à criopreservação. Dessa forma, talvez parte da degeneração acrossomal imposta pela criopreservação seja induzida pela entrada de cálcio na parte apical da cabeça do espermatozoide, que se assemelha à induzida pelo tratamento com o ionóforo. Apontando a alta concentração de cálcio no meio extracelular como possível responsável pela RA prematura durante a criopreservação. Szász *et al.* (1997) testando indução de RA, elegeram uma concentração de cálcio ideal para tal de 4mg/dL, indicando que níveis acima deste valor induzem à deterioração dos espermatozoides e menores concentrações não induzem RA. Considerando que, no presente experimento, observou-se no tratamento 3, após o descongelamento, a menor concentração média de Ca<sup>2+</sup> em torno de 3.98 mg/dL,

concentração equivalente ao nível preconizado para a indução de reação acrossômica segundo estes autores.

Tabela 8: Teste de termorresistência de sêmen de cães submetido ao congelamento sem adição de EDTA.

	Cão 1	Cão 2	Cão 3	Média
Vigor 0	3,00	2,67	2,83	2,85 ± 0,24
Motilidade 0	72,50	63,33	66,67	68 ± 6,32
Vigor 15	2,38	1,67	2,83	2,30 ± 0,89
Motilidade 15	35,00	33,33	61,67	42,5 ± 23,48
Vigor 30	1,75	1,50	2,67	1,95 ± 0,86
Motilidade 30	20,00	23,33	61,67	33,5 ± 23,34
Vigor 45	1,75	1,50	2,33	1,85 ± 0,75
Motilidade 45	11,25	20,00	56,67	27,5 ± 22,52
Vigor 60	1,88	1,50	2,33	1,90 ± 0,74
Motilidade 60	8,00	16,67	50,00	23,20 ± 20,47
Vigor 75	1,88	1,33	2,17	1,80 ± 0,71
Motilidade 75	6,75	9,00	40,00	17,40 ± 17,89
Vigor 90	1,50	0,67	2,17	1,45 ± 1,01
Motilidade 90	1,75	6,67	33,33	12,70 ± 17,18
Vigor 105	0,50	0,67	2,17	1,05 ± 1,12
Motilidade 105	0,50	5,00	30,00	10,7 ± 15,76
Vigor 120	0,50	0,67	2,17	1,05 ± 11,12
Motilidade 120	0,50	5,00	25,00	9,2 ± 13,36

0; 15; 30; 45; 60; 75; 90; 105; 120 = tempo de incubação

Valores referentes às médias ± desvio padrões.

Bittencourt *et al.* (2004) não encontraram diferença significativa após TTR das amostras contendo EDTA em caprinos. O sêmen canino normalmente apresenta baixo desempenho no teste de termorresistência após o descongelamento, quando comparado com outras espécies (Mascarenhas, 2006). Em cães, a longevidade não está necessariamente relacionada à fertilidade: Ström *et al.* (1997) encontraram maior motilidade pós congelamento (74%) mas a menor longevidade (20% após 1 hora a 37°C). Porém, obtiveram taxa de fertilização de 85% utilizando o mesmo sêmen em IA intrauterina.

Tabela 9: Teste de termorresistência de sêmen de cães submetido ao congelamento com adição de 0,1% EDTA.

	Cão 1	Cão 2	Cão 3	Média
Vigor 0	3,00	2,67	3,00	2,9 ± 0,21
Motilidade 0	67,50	70,00	76,67	71 ± 8,76
Vigor 15	2,38	2,33	2,83	2,50 ± 0,41
Motilidade 15	35,00	43,33	66,67	47,00 ± 12,94
Vigor 30	1,88	2,33	2,83	2,3 ± 0,48
Motilidade 30	15,00	36,67	60,00	35 ± 21,73
Vigor 45	1,88	2,17	2,50	2,15 ± 0,41
Motilidade 45	8,75	33,33	56,67	30,50 ± 22,91
Vigor 60	1,88	2,00	2,50	2,10 ± 0,39
Motilidade 60	7,00	23,33	46,67	23,80 ± 18,41
Vigor 75	1,88	2,00	2,50	2,10 ± 0,39
Motilidade 75	5,00	20,00	41,67	20,50 ± 17,03
Vigor 90	1,88	1,83	2,17	1,95 ± 0,28
Motilidade 90	3,25	15,00	30,00	14,80 ± 13,36
Vigor 105	2,00	1,83	2,17	2 ± 0,24
Motilidade 105	2,50	13,33	26,67	13 ± 12,22
Vigor 120	2,00	1,50	2,17	1,9 ± 0,39
Motilidade 120	2,25	9,33	21,67	10,2 ± 11,69

0; 15; 30; 45; 60; 75; 90; 105; 120 = tempo de incubação

Valores referentes às médias ± desvio padrões.

No presente experimento, os animais 1 e 2 apresentaram uma redução de motilidade espermática, ao valor mínimo preconizado pelo colégio Brasileiro de Reprodução Animal para a espécie bovina (15%) entre 30 e 75 minutos em todos os tratamentos no TTR (Tabela 8, 9 e 10). Porém o animal 3 apresentou redução na motilidade espermática mais lenta, mantendo valores superiores a 15% após 120 minutos de teste (Tabela 8, 9 e 10). Assim, observa-se uma forte influência individual na longevidade espermática, não relacionada às alterações realizadas no meio de congelamento para este experimento, já que nos três tratamentos este animal apresentou resultados superiores aos outros.

Tabela 10: Teste de termorresistência de sêmen de cães submetido ao congelamento com adição de 0,25% EDTA.

	Cão 1	Cão 2	Cão 3	Média
Vigor 0	3,00	2,50	2,83	2,83 ± 0,25
Motilidade 0	70,00	65,00	73,33	70 ± 7,07
Vigor 15	2,38	2,25	2,67	2,44 ± 0,46
Motilidade 15	42,50	45,00	63,33	50 ± 14,14
Vigor 30	2,13	2,25	2,50	2,28 ± 0,36
Motilidade 30	18,75	30,00	53,33	32,78 ± 16,98
Vigor 45	2,00	2,00	2,50	2,17 ± 0,35
Motilidade 45	14,50	20,00	46,67	26,44 ± 17,57
Vigor 60	2,00	2,00	2,50	2,17 ± 0,35
Motilidade 60	8,25	17,50	40,00	20,89 ± 15,96
Vigor 75	2,00	2,00	2,17	2,06 ± 0,17
Motilidade 75	6,25	15,00	31,67	16,67 ± 12,50
Vigor 90	2,00	2,00	2,00	2 ± 0,25
Motilidade 90	4,25	12,50	23,33	12,44 ± 11,88
Vigor 105	2,00	2,00	1,83	1,94 ± 0,17
Motilidade 105	2,50	12,50	16,67	9,44 ± 9,06
Vigor 120	2,00	2,00	1,83	1,94 ± 0,17
Motilidade 120	2,25	10,00	16,67	8,78 ± 9,27

0; 15; 30; 45; 60; 75; 90; 105; 120 = tempo de incubação

Valores referentes às médias ± desvio padrões.

## 6. CONCLUSÕES

A concentração de cátions obtida para o grupo de animais estudado esteve compatível com mensurações descritas na literatura para outros grupos de cães, com altas concentrações de sódio e baixas de potássio e cálcio. A concentração de fosfatase alcalina (FA) apresentou comportamento compatível com o descrito na literatura, com nível marcadamente superior na alíquota seminal oriunda do epidídimo em relação à fração prostática, nos três animais estudados. A concentração de FA sofre forte influência individual, mas não possui correlação com os níveis de cálcio presentes no plasma seminal e com os percentuais de lesão de membranas espermáticas após o descongelamento em diferentes concentrações de EDTA.

O sêmen dos três cães estudados mostrou-se sensível ao processo de congelamento, com elevado percentual de lesões de membranas plasmática e acrossomal após o descongelamento.

Obteve-se elevada concentração de cálcio no meio base de congelamento (Tris-citrato-gema de ovo acrescido de glicerol e equex), correspondendo a mais de dez vezes a concentração de cálcio obtida na fração rica em espermatozoides. O uso do EDTA indisponibilizou quantidade significativa de cálcio do meio de congelamento aos quais foi adicionado em 0,1% e 0,25% mas, ainda assim, a concentração deste cátion permaneceu alta em relação ao plasma seminal fresco.

Em sêmen de cão, a adição de EDTA ao meio de congelamento nas concentrações de 0,1% e 0,25% não surte efeito significativo nos parâmetros avaliados de qualidade espermática: vigor, motilidade, teste hiposmótico, morfologia e integridade de membrana plasmática e acrossomal.

As concentrações de EDTA utilizadas neste trabalho não foram suficientes para indisponibilizar o cálcio extracelular a níveis preventivos à lesão acrossômica dos espermatozoides caninos, porém, não surtiu efeito tóxico em concentrações de 0,1% e 0,25% no meio de congelamento de sêmen, o que abre precedente para a avaliação do efeito de maiores concentrações deste quelante de cálcio.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABINPET. Abinpet faz balanço do mercado brasileiro de animais de estimação. Monitor Digital. 25/09/2012. Disponível em: <http://www.monitormercantil.com.br> acesso em 28/01/2013.
- AISEN, E.G.; ALVAREZ, H.L.; VENTURINO, A.; GARDE, J.J. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, 53:1053-1061, 2000.
- ALHAIDER, A.K. & WATSON, P.F. Cryopreservation of dog semen: The effect of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. *Anim. Reprod. Sci.*, 110:147-161, 2009.
- AMANN, R.P. & PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, 7(3):145-173, 1987.
- ANDERLINE, G.P.O.S.; ANDERLINE, G. A. Benefícios do envolvimento do animal de companhia (cão e gato), na terapia, na socialização e bem estar das pessoas e o papel do médico veterinário. *Revista CFMV*, 41:70-75, 2007.

- ARAÚJO, G.R. *Uso de sondas fluorescentes e ensaio de ligação a ovócitos heterólogos e a membrana perivitelinica de ovo de galinha (Gallus gallus) para a avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de jaguatirica (Leopardus pardalis)*. 2012. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, MG.
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.*, 21(1):01-07, 2000.
- BARTLETT, D.J. Studies on dog semen I-Morphological characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, 3:173-189, 1962.
- BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO, A.L.; SANTOS, A.D. F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R.B.S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A.P.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, J.D. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. *Ciência Animal Brasileira*, 5(1):27-32, 2004.
- BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; LIMA, M.C.C.; ALVES, S.G.G.; VASCONCELOS, M.F.; BISCARDE, C.E.; LEAL, L.S.; OBA, E. Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 45(4):305-312, 2008.
- BRADLEY, T.; KING, R.S. The Dog Economy Is Global—but What Is the World's True Canine Capital? *The Atlantic*, 13/11/2012. Disponível em: [www.theatlantic.com](http://www.theatlantic.com). Acesso em 27/01/2013.
- BREDA, F.C.; EUCLYDES, R.F.; PEREIRA, C.S.; TORRES, R.A.; CARNEIRO, P.L.S.; SARMENTO, J.L.R.; TORRES FILHO, R.A.; MOITA, A.K.F. Endogamia e limite de seleção em populações selecionadas obtidas por simulação. *R. Bras. Zootec.*, 33(6):2017-2025, 2004.
- BREITBART, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrossomal reaction. *Mol. Cell. Endocrinol*, 187:139-144, 2002.
- BREWIS, I.A.; MORTON, I.E.; MOORE, H.D.M.; ENGLAND, G.C.W. Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Molec. Reproduc. and Develop.*, 60:491-497, 2001.
- BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D.; VALENTIM, F.M. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. I – Efeito do meio diluidor. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 53(3):364-371, 2001.
- CELEGHINI, E.C.C. *Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides, utilizando sondas fluorescentes*. 2005. 188f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo (USP). Pirassununga, SP.
- CHANDLER, J.A.; SINOWATZ, F.; PIERREPOINT, C.G. The ultrastructure of dog epididymis. *Urol. Res.*, 9:33-44, 1981.

- CHIARELLO, A. G.; AGUIAR, L.S.; CERQUEIRA, R.; MELO, F.R.; RODRIGUES, F.H.G.; SILVA, V.M.F.; OLIVEIRA, T.G. Mamíferos. In: MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*, 1ª reimpressão. Brasília, MMA, BRASIL, p.681-880, 2010.
- CHIRINÉA, V.H. *Inseminação artificial com sêmen congelado em cães*. 2008. 85f. Tese (doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, SP.
- CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I. M.; SOUZA, F.F.; TEBET, J.M.; PAPA, F.O.; LOPES, M.D. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. *Ci. Ani. Bras.*, 7(4):407-415, 2006.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal*. 2nd ed. Belo Horizonte, 54p. 1998.
- CONCANNON, P.W; MCCANN, J.P; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 39:3-25, 1989.
- CORMIER, N.; BAILEY, J.L. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation. *Biol. Reprod.*, 69:177-185, 2003.
- COSTA, M.Z.; OLIVEIRA, L.Z.; RESENDE, M.V.; LUCIO, A.C.; PERINI, A.P.; MIGUEL, M.C.V.; LIMA, V.F.M.H. Induction of the acrosome reaction test to *in vitro* estimate embryo production in Nelore cattle. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 629(4):771-777, 2010.
- CSERMAK JR, A.C. *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*. 2011, 71f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, MG.
- CUNHA, I.C.N. *Criopreservação do sêmen de cães*. 2002. 149f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Botucatu, SP.
- CUNHA, I.C.N. Exame andrológico do cão. *J. Bras. Ciên. Ani.*, 1(1):49-65, 2008.
- CUNHA, I.C.N. & LOPES, M.D. Efeito de três diferentes diluidores sobre o sêmen canino submetido a dois protocolos de descongelamento. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 42(5):372-380, 2005.
- DAL-FARRA, R.A. Representações de animais de companhia na cultura contemporânea: uma análise na mídia impressa. *Semiosfera*, 7, 2004. Disponível em: <http://www.semiosfera.eco.ufrj.br>. Acessado em: 07 de jan de 2013.

- DECO-SOUZA T., PAULA T.A.R., COSTA D.S., COSTA E.P., BARROS J.B.G., ARAUJO G.R. & CARRETA-JR M. Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(4), 512-516, 2013.
- DE BLAS, G.A.; ROGGERO, C.M.; TOMES, C.N.; MAYORGA, L.S. Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *Plasbiology.*, 3(10): 1801-1812, 2005.
- DHAMI, A. J.; SAHNI, K.L.S.O. Effect of extenders, additives and deep freezing on the leakage of lactic dehydrogenase from cattle and buffalo spermatozoa. *Indian Journal of Animal Sciences*, 63(3):251-256, 1993.
- DO VALLE, V.B. O uso de cães como ferramenta para resolução de ocorrências críticas. *Série práticas e saberes policiais*, 1:11-21, 2009. Disponível em <http://rededepolicias.sv.com.br>. Acessado em 18/01/2013.
- EGITO, A.A.; MARIANTE A.S.; E ALBUQUERQUE M.S.M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Arch. Zootec.*, 51, 39-52. 2002.
- EILTS, B.E. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, 64, 685-691, 2005.
- ETTINGER, S.J. & FELDMAN, E.C. *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat* (7th ed.). St. Louis, MO.: Elsevier Saunders, 2010.
- ENGLAND, G.C.W. & ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, 37(2):373-381, 1992.
- ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E.; MIDDLETON, D.J. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Research Vet. Science*, 49: 66-70, 1990.
- FARSTAD, W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen sêmen. *J. Small. Anim. Pract.*, 25(9):561-565, 1984.
- FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, 60(61):375-387, 2000.
- FLORMAN, H.M. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular  $Ca^{2+}$  are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev. Boil.*, 165:152-164, 1994.
- FRENETTE, G.; DUBÉ, J.Y.; TREMBLAY, R.R. Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. *Arch. Androl.*, 16(3):235-41, 1986.
- FROMAN, D.P.; AMANN, R.P.; RIEK, P.M.; OLAR, T.T. Acrosin activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage. *J. Reprod. Fertil.*, 70:301-308, 1984.
- GADELLA, B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Ani. Reprod. Sci.*, 107:229-236, 2008.

- GALIBERT, F.; QUIGON, P.; HITTE, C.; ANDRÉ, C. Toward understanding dog evolutionary and domestication history. *C. R. Biol.*, 334(3):190-196, 2011.
- GAO, G.Y.; ASHWORTH, E.; WATSON, P.F.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P.; CRITSER, J.K. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol. Reprod.*, 49:112–123, 1993.
- GARAY, R.M. *Uso de sondas fluorescentes para avaliação seminal de ejaculado de gato do mato pequeno (Leopardus tigrinus) e ensaio de ligação à membrana perivitelinica de ovo de galinha (Gallusgallus) como ferramenta de predição de fertilidade espermática*. 2012. 57f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, MG.
- GARNER, D.L. & HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, E.S.E. & HAFEZ, B. *Reprodução Animal* (7th ed). Barueri, SP: Manole Ltda, 2004.
- GOBELLO, C.; CORRADA, Y. Biotechnology in canine reproduction: an update. *Acta. Vet.*, 23(1):30-37, 2003.
- GOODROWE, K.L.; WALKER, S.L.; RYCKMAN, D.P.; MASTROMONACO, G.F.; HAY, M.A.; BATEMAN, H.L.; WADDELL, W.T. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. *Ani. Reprod. Sci.*, 60(61):389–403, 2000.
- GÜNZEL, A.R. & KRAUSE, D. Läufigkeitsüberwachung und Samenübertragung beim Hund. *Tierärt. Umsch.*, 8:566-570, 1986.
- HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNEENSACK, R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullene jakulaten. *Vet. Med. Leipzig*, 38(1):105-144, 1984.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Criopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.*, 11(1):73-88, 1990.
- HEWITT, D.A. & ENGLAND, G.C.W. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Ani. Reprod. Sci.*, 51:321–332, 1998.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. *Anim. Reprod., Sci.*, 62:3-22, 2000.
- HONEYCUTT, R.L. Unraveling the mysteries of dog evolution. *BMC Biology*, 8(20):1-5, 2010. Disponível em: [www.biomedcentral.com/1741-7007/8/20](http://www.biomedcentral.com/1741-7007/8/20).
- HONG, C.Y.; CHIANG, B.N.; TURNER, P. Calcium ion is the key regulator of human sperm function. *Lancet.*, 2:1449 –1451, 1984.
- IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55:671–684, 2001.
- JAMES, R.W.; HEYWOOD, R.; STREET A. E. Biochemical observations on beagle dog semen. *J. Brit. Vet. Assoc.*, 104:480-482, 1979.

- JOHNSON, C.A. Distúrbios do sistema reprodutivo. In: NELSON, R.W.; COUTO C.G. *Medicina interna de pequenos animais*. (4th Ed). Elsevier Editora. 2010.
- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, R.; OLSON, M.V.; PATRICIA, S. *Canine and feline theriogenology*. Saunders, Philadelphia. 2001.
- KILIÇ, S.; SARICA, K.; YAMAN, O.; SOYGÜR, T.; GÖGÜS, O.; YAMAN, L.S. Effect of total and ionized calcium levels of seminal fluid on sperm motility. *Urol. Int.*, 56: 215-218, 1996.
- KUMAR, S.; YING, Y.K.; HONG, P.; MADDIAH, V.T. Potassium increases intracellular calcium simulating progesterone action in human sperm. *Arch. Androl.*, 44(2): 93-101, 2000.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hipo-osmotic test. *Theriogenology*, 39:1279-1 289, 1993.
- KUSTRITZ, M.R. Clinical canine and feline reproduction – evidence-based answers. 316p. Wiley-Blackwell, Iowa. 2010.
- KUTZLER, M.A. Semen collection in the dog. *Theriogenology*. 64:747–754, 2005.
- LEE, C.H.; ANDERSON, M.; CHIEN, Y.W. Characterization of in-vitro spermicidal activity of chelating agent against human sperm. *J. Pharm. Sci.*, 85(6):649-654, 1996.
- LEPPANEN, M.; MAKI, K.; SALONIEMI, H. Estimation of heritability of hip dysplasia in German Shepherd dogs in Finland. *J. Anim. Breed. Genet.*, 177:97-103, 2000.
- LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 39:299-310, 1989.
- LINDE-FORSBERG, C. Artificial insemination with fresh, chilled, extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Sem. Vet. Med. and Surg. (Small Animal)*, 10(1):48-58, 1995.
- LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *J. Reprod. Fertil.*, 47:313-23, 1993.
- LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S.; BECCAGLIA, M. Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. *Reprod. Dom. Ani.*, 14:286-290, 2006.
- LUVONI, G.C.; KALCHSCHIMIDT, E.; LEONI, S.; RUGGIERO, C. Conservation of feline semen – part I: cooling and freezing protocols. *J. Feline Med. Surg.*, 5: 203-208, 2003.
- MACLAUGHLIN, E.A.; FORD, W.C.L.; HULL, M.G.R. Adenosine triphosphate and motility characteristics of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 17:19–23, 1994.

- MCLAUGHLIN, E.A.; FORD, W.C.L.; HULL, M.G.R. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. *J. Reprod. Fert.*, 95:749-754, 1992.
- MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. Capacitation, acrosome reaction, and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. *Gamete Res.*, 1:101-109, 1978.
- MARENCO, S.R. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Ani. Reprod. Sci.*, 105:52-63, 2008.
- MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk Tris extenders. *Theriogenology*, 66: 2047-2055, 2006.
- MASCARENHAS, R.M. *Avaliação individual e racial da qualidade do sêmen canino in natura e criopreservado em diferentes protocolos*. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, MG.
- MCPHAIL, D.B.; GOODMAN, B.A. Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems. *Bioch. J.*, 221:559-560, 1984.
- MENDONÇA, R.A.B. *Características de sêmen canino refrigerado - comparação entre três diluidores diferentes*. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa.
- MESSIAS C. *Algumas características do sêmen do cão após diluição e resfriamento*. 2000. 61f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor de Ciências Agrárias. Curitiba, PR.
- MORTON, B.E.; SAGADRACA, R.; FRASER, C. Sperm motility within the mammalian epididymis: species variation and correlation with free calcium levels in epididymal plasma. *Fertil. Steril.*, 29:659-98, 1978.
- MOTTA, V.T. *Bioquímica Clínica: princípios e interpretações*. Editora: Médica Massau, 2000.
- NÖTHLING, J.O.; SHUTTLEWORTH, R.; HAAS, K.; THOMPSON, P.N. Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology*, 64:975-991, 2005.
- OETTLE, E.E. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Ani. Reprod. Sci.*, 12:145-150, 1986.
- ORGBIN-CRIST, M.C. Studies on the function of the epididymis. *Biol. Reprod. Suppl.* 1, 1:55-175, 1969.
- PANDY, V.K.; PARMESHWARAN, M.; SOMAN, S.D. Concentration of morphologically normal, motile spermatozoa: Mg, Ca and Zn in the semen of fertile men. *Sci. Total Environ*, 27: 49-52, 1983.

- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38: 209-222, 1992.
- PAULA T.A.R. Reprodução de carnívoros silvestres. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 35(2):130-132, 2011.
- PEÑA, A.I.; LUZ, L.L.; BARRIO, M.; HERRADÓN, P.G.; QUINTO, L.A. Effect of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular  $Ca^{2+}$  concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 59:1725-39, 2003.
- PEÑA, A.I. & LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, on or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thawed survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54:859-875, 2000.
- PEREIRA, E.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Correlação genética entre perímetro escrotal e algumas características reprodutivas na raça nelore. *Rev. Bras. Zootec.*, 29(6):1676-1683, 2000.
- PETERSON, R.N.; SILVERSTAIN, K.; FREUND, M. A rapid fluorometry method for the determination of DNA in human semen. *J. Reprod. Fertil.*, 41:485-488, 1974.
- PONGLOWHAPAN, S.; ESSEN-GUSTAVSSON, B.; LINDE FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 62:1498-1517, 2004.
- PRIEN, S.D.; LOX, C.D.; MESSER, R.H.; DE LEON, F.D. Seminal concentrations of total and ionized calcium from men with normal and decreased motility. *Fertil. Steril.*, 54:171-172, 1990.
- PUBLICOVER, S.J. & BARRATT, C.L.R. Voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels and the acrosome reaction: which channels are present and what do they do? *Hum. Reprod.*, 14(4):873-879, 1999.
- QUINN, P. J.; WHITE, I.G.; WIRRICK, B.R. Studies of the distribution of the major cations in semen and male accessory secretions. *J. Reprod. Fertil.*, 10: 379-388, 1965.
- ROBLERO, L.; GUADARRAMA, A.; ORTIZ, M.E.; FERNÁNDEZ, E.; ZEGERS-HOCHSCHILD, F. High potassium concentration improves the rates of acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 49: 676-9, 1988.
- RODRIGUES, B.A. *Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado*. 1997. 177f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS.
- RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Efeito da adição de diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) ao diluidor a base de Tris sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen canino criopreservado. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, 26(2):32-49, 1998.

- ROONEY, N.; SARGAN, D. *Pedigree Dog Breeding in the UK: A major welfare concern?* Independent scientific report commissioned by the RSPCA. 2010. Disponível em: [www.rspca.org.uk/pedigreedogs](http://www.rspca.org.uk/pedigreedogs).
- ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.; VANNOZZI, J.; ROMAGNOLI, S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations in freezing/thawing rates. *Reprod. Dom. Ani.*, 33:355-361, 1998.
- ROTA, A.; STÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine sêmen stored at 4°C. *Theriogenology*, 44:885-900, 1995.
- SANTOS, I.W.; LIMA, V.F.M.H.; NISFELD, L.C.; RIBEIRO, A.P.C. Congelação do sêmen canino comparando diferentes concentrações de glicerol e diferentes tempos de equilíbrio. *Arch. Vet. Sci.*, 8(2): 57-62, 2003.
- SCHACKMANN, R.W.; CHRISTEN, R.; SHAPIRO, B.M. Membrane potential depolarization and increased intracellular pH accompany the acrosome reaction of sea urchin sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:6066-6070, 1981.
- SCHELLING, C.; GAILLARD, C.; DOLF, G. Genetic variability of seven dog breeds based on microsatellite markers. *J. Anim. Breed. Genet.*, 122:71-77, 2005.
- SHIOTSUKI, L.; SILVA, J.A.II.V.; ALBUQUERQUE, L.G. Associação genética da prenhez aos 16 meses com o peso à desmama e o ganho de peso em animais da raça Nelore. *R. Bras. Zootec.*, 38(7):1211-1217, 2009.
- SILVA, A.R. *Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos*. 2005 166f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, CE.
- SILVA L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet. Rec.*, 138:154-157, 1996.
- SILVA, A.R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 31(1):119-127, 2007.
- SIRIVAIIDYAPONG, S.; BEVERS, M.M.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B. Induction of the acrosome reaction in dog sperm cells is dependent on epididymal maturation: the generation of a functional progesterone receptor is involved. *Mol. Reprod. and Devel.*, 58:451-459, 2001.
- SOARES, M.P.; ROSSI, C.A.R.; MEZZALIRA, A.; CECIM, M. Etilenoglicol na criopreservação de sêmen canino. *Ciência Rural*, 32(4):649-655, 2002.
- SOUZA, F.F. *Caracterização eletroforética do perfil proteico e análise bioquímica do plasma seminal canino*. 2003 97f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP.
- SOUZA, F.F. Proteínas do sêmen do cão são importantes ou não na fertilização? *Rev Bras Reprod Anim.*, 31(1):108-114, 2007.

- SOUZA, J.A.T.; SPICCIATI, W.; VISINTIN, J.A.; BARNABÉ, V.H.; BARNABÉ, R.C. Características seminais de cães da raça pastor alemão. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 32: 181-6, 1995.
- SPUNGIN, B. & BREITBART, H. Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J. Cell Sci.*, 109:1947-1955, 1996.
- STRÖM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology.*, 48:247-256, 1997.
- SWANSON, W.F & BROWN, J.L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. *Anim. Reprod. Sci.*, 82:21-34, 2004.
- SZÁSZ, F.; CHENG, F.P.; MARKS, A.; COLENBRANDER, B.; SOLTI, L. Induction of acrosome reaction in dog sperm by calcium ionophore. *Acta Vet. Hung.*, 45(2):177-187, 1997.
- SZÁSZ, F.; SIRIVAIYAPONG, S.; CHENG, F.P.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; COLENBRANDER, B.; SOLTI, L.; GADELLA, B.M. Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol Reprod Dev.*, 55:289-298, 2000.
- THOMASSEN, R.; SANSON, G.; KROGENÆS, A.; FOUIGNER, J.A.; ANDERSEN BERG, K; FARSTAD, W. Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology.* 66:1645–1650, 2006.
- TSUTSUI, T.; KAWAKAMI, E.; MURAO, I.; OGASA A. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: Observations through uterine fistula. *Nihon Juigaku Zasshi*, 51(3):560-565, 1989.
- TURNER, R.M.O.; MCDONNELL, S.M. Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. *Theriogenology*, 60:1-10, 2003.
- VAN GESTEL, R.A.; BREWIS, I.A.; ASHTON, P.R.; BROUWERS, J.F.; GADELLA, B.M. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Mol. Hum. Reprod.*, 13(7):445–454, 2007.
- VERGINELLI, F.; CAPELLI, C.; COI, A.V.; MUSIANI M.; FALCHETTI M.; OTTINI L.; PALMIROTTA R.; TAGLIACCOZZO A.; DE GROSSI MAZZORIN I.; MARIANI-COSTANITINI R. Mitochondrial DNA from prehistoric canids highlights relationships between dogs and and south-east European wolves. *Molec. Biol. Evolution.*, 22:2541-2551, 2005.
- VIANA, V.M.; TABANEZ, A.A.J. Biology and conservation of forest fragments in the Brazilian Atlantic moist forest. In: SCHELHAS, J.; GREENBERG, R.S. *Forest patches in tropical landscapes*. Washington: Island Press. 1996, 167f .
- VIEIRA, J.G.H. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 43(6):414-422 1999

- VILÀ, C.; SAVOLAINEN, P.; MALDONADO, J.E.; AMOIM, I.R.; RICE, J.E.; HONEYCUTT, R.L.; CRANDALL, K.A.; LUNDEBERG, J.; WAYNE, R.K.; Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, 276:1687-1689, 1997.
- VILLAVERDE, A.I.S.B. *Comparação entre dois métodos de inseminação artificial utilizando sêmen congelado em gatos domésticos (Felis catus)*. 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP.
- WALES, R.G.; WHITE, I.G. Some observations on the chemistry of dog semen. *J. Reprod. Fertil*, 9:60-77, 1965.
- WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. In: FINN, C. A. *Oxford Rev Reprod B*. New York: Oxford University Press. 1979, p.283-330.
- WATSON, P.F. Artificial insemination and the preservation of the semen. In: LAMMYNG, G.E. *Marshall's physiology of reproduction, Volume 2*. (4th ed). Edinburgh: Churchill Livingstone. 1990, p.747- 869.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Ani. Reprod. Sci.*, 60(61):481-492, 2000.
- WILSON, M.S. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen. *J. Rep. Fert. Suppl.*, 47:307-311, 1993.
- WITTE, T.S. & SCHÄFER-SOMI, S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 102:181-193, 2007.
- WONG, W.Y.; FLIK, G.; GROENEN, P.M.W.; SWINKELS, D.W.; THOMAS, C.M.G.; COPIUS-PEEREBOOM, J.H.J.; MERKUS, H.M.W.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod. Tox.*, 15:131-136, 2001.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo I: Composição dos meios utilizados.

Meio de manutenção (diluição do sêmen fresco)

Componente	Quantidade
TRIS	24 g/L
Ácido cítrico monohidratado	14 g/L
Glicose	8 g/L
Amicacina	2 g/L
Gema de ovo	200 g/L

Meio base de congelamento (Tratamento 1)

Componente	Quantidade
TRIS	24 g/L
Ácido cítrico monohidratado	14 g/L
Glicose	8 g/L
Amicacina	2 g/L
Gema de ovo	200 g/L
Glicerol	12%
Equex	1%

Meio de congelamento para o Tratamento 2.

Componente	Quantidade
EDTA	0,02g
Meio base de congelamento (q.s.p)	10mL

Meio de congelamento para o Tratamento 3.

Componente	Quantidade
EDTA	0,05g
Meio base de congelamento (q.s.p)	10mL

## **8.2. Anexo II: Diluições dos fluoróforos para preparo das soluções estoque e de trabalho das sondas fluorescentes**

### **Höchst 33342** (Molecular probes H1399)

Protocolo solução estoque (25mg/mL):

- 100mg de H342 + 4mL de DMSO (Sigma D2650)

Protocolo solução de trabalho (40µg/mL):

- 1,6µL da solução estoque + 998,4 µL de DPBS (Sigma D8662)

Aliquotar em frações de 1mL e armazenar a temperatura inferior -4°C no escuro.

### **Iodeto de propídio** (Sigma Aldrich P4170)

Protocolo solução estoque (25mg/mL):

- 25mg de IP + 1 mL de DMSO (Sigma D2650)

Protocolo solução de trabalho (0,5mg/mL):

- 20 µL da solução estoque (25mg/mL) + 980 µL de DPBS (SigmaD8662)

Aliquotar em frações de 0,2 mL e armazenar a temperatura inferior -4°C no escuro.

### **Fit-C PSA** (Sigma L0770)

Protocolo solução de trabalho (100 µg/mL):

- 2mg de FIT-C PSA;
- Adicionar 2mL de solução de ázida sódica (em DPBS) a 10%;
- Adicionar DPBS q.s.p.: 20mL (Sigma D8662)

Aliquotar em frações de 1mL armazenar a temperatura de 4°C (geladeira) no escuro.