

THYARA DE DECO SOUZA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE UM QUELANTE DE CÁLCIO SOBRE A
QUALIDADE DO SÊMEN DESCONGELADO DE CÃES**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

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

T

S729e
2013 Souza, Thyara de Deco, 1984-
Efeito da adição de um quelante de cálcio sobre a
qualidade do sêmen descongelado de cães / Thyara de Deco
Souza. – Viçosa, MG, 2013.
ix, 44f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.30-42.

1. Cão - Sêmen. 2. Ácido etilenodiaminotetraacético.
3. Quelatos. 4. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc..
5. Sêmen - Criopreservação. 6. Sêmen. 7. Sêmen - Morfologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 636.7089261

THYARA DE DECO SOUZA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE UM QUELANTE DE CÁLCIO SOBRE A
QUALIDADE DO SÊMEN DESCONGELADO DE CÃES**

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

APROVADA: 26 de julho de 2013.

Eduardo Paulino da Costa
(Coorientador)

Antônio Carlos Csermak Júnior

Juliano Vogas Peixoto

José Domingos Guimarães

Tarcízio Antônio Rego de Paula
(Orientador)

Ao meu esposo Gediendson, e aos meus pais, Márcio José e Fátima Izabel.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem seu amor não somos nada.

Aos meus pais, Márcio e Fátima, pelo amor incondicional e apoio aos meus estudos e sonhos. Amo e admiro muito vocês!

À Thaiz, pela amizade (e pelo sobrinho lindo, que encheu nossas vidas de alegrias). Ao longo desses anos compartilhamos muito mais que o amor pelos animais.

Ao grande homem que Deus colocou no meu caminho, Gediendson. Obrigada meu amor, sua presença me fortalece! Um agradecimento especial pela sua colaboração neste trabalho. Se não fossemos um time, esta tese não existiria.

Ao meu orientador (e padrinho), Tarcizio A.R. de Paula, que me orienta desde a minha primeira semana de graduação. Obrigada pela amizade, você é um exemplo de integridade e respeito aos animais!

Ao coorientador Eduardo Paulino, sua colaboração é essencial para o nosso laboratório.

Ao professor José Domingos Guimarães pelas colocações a respeito dos nossos trabalhos.

Ao Dr. Antônio Carlos Csermak Júnior pela amizade e imensa colaboração neste trabalho.

Ao Juliano Vogas Peixoto. Ju sua contribuição vai muito além dessa Tese. Obrigada pelo exemplo de pessoa e profissional que você é.

Aos amigos e companheiros de laboratório Letícia Bergo, Antônio Carlos e Gediendson, nós sabemos o peso de literalmente construir nosso local de trabalho.

A todos do Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Animais Silvestres (REPAAS-UFV) que colaboraram, e muito, para a realização deste trabalho: Gediendson, Letícia, Antônio Carlos, Fernanda, Jade, Graziella, Lina e Mayra muito obrigada pela ajuda e compreensão.

Aos animais que contribuíram para este trabalho, três “caras” muito especiais, que nos deram também muito carinho.

Aos meus filhotes Bequinha, Chiquinho, Iraci e Jaguar (*in memorian*), que me proporcionam diariamente momentos de carinho e alegria despreziosos.

A todos os animais e amigos que passaram pelo CETAS-UFV, vocês possibilitaram a realização de meu sonho de trabalhar com animais silvestres.

Aos colegas de trabalho do Centro de Controle de Zoonoses de Cariacica, Priscilla, Fabrício, Daniel e Cristina. A compreensão e a amizade de vocês me deram tranquilidade para a realização deste trabalho.

À FAPEMIG pela bolsa.

À FAPEMIG e ao CNPQ pelos financiamentos ao Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Animais Silvestres da UFV (REPAAS-UFV).

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Fisiologia espermática	3
2.2. Criopreservação espermática	5
2.3. Avaliação espermática	9
2.3.1. Sondas fluorescentes	10
2.3.2. Teste de ligação	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Animais	14
3.2. Coleta e processamento do sêmen	14
3.3. Criopreservação	15
3.4. Teste de termorresistência	16
3.5. Teste de ligação à membrana perivitelina do ovo de galinha	17
3.6. Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal	19
3.7. Análises estatísticas	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS	43

RESUMO

SOUZA, Thyara de Deco, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Efeito da adição de um quelante de cálcio sobre a qualidade do sêmen descongelado de cães.** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Objetivou-se por meio deste trabalho avaliar o efeito da redução da quantidade de cálcio livre no meio de congelamento, utilizando o quelante de cálcio EDTA nas concentrações de 0,3% e 0,5%, sobre a qualidade do sêmen descongelado de cães. O ejaculado de três cães sem raça definida foi coletado por manipulação peniana e avaliado quanto ao vigor, motilidade espermática, morfologia espermática e pelo teste hiposmótico (HOST). Posteriormente, o sêmen foi separado em três alíquotas, as quais foram diluídas respectivamente no meio controle (TGE), de forma a se obter uma concentração final de 50×10^6 espermatozoides móveis/mL, 6% de glicerol e 0,5% de Equex STM Paste[®] em meio Tris-Citrato com gema de ovo (20% V/V); no meio de congelamento EDTA 0,3, com a mesma constituição do TGE, porém acrescido de EDTA para uma concentração final de 0,3%; e no meio de congelamento EDTA 0,5 em que o EDTA foi acrescido para uma concentração final de 0,5%. Após envasado em palhetas de 0,25mL o sêmen de cada tratamento foi resfriado por duas horas e congeladas em vapor de nitrogênio por 15 minutos. As amostras foram descongeladas por imersão em água a 37°C, durante sete segundos e avaliadas da mesma forma que o sêmen fresco e pelos testes de termorresistência, de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (MPOG) e quanto à integridade das membranas plasmática e do acrossoma por coloração com sondas fluorescentes. A concentração do cálcio foi dosada, em espectrofotômetro, no sêmen fresco diluído no meio TGE e depois de descongelado. Houve redução (Duncan a 5% de significância; $p < 0,05$) na concentração de cálcio em ambos os tratamentos EDTA 0,3 e EDTA 0,5, porém somente quando EDTA foi adicionado para a concentração final de 0,5% foi possível indisponibilizar todo o cálcio livre presente no meio. De acordo com a coloração por sondas fluorescentes a redução ou a eliminação do cálcio livre no meio não foi capaz de reduzir a quantidade de espermatozoides descongelados com acrossoma lesado/reagido ($p > 0,05$) em relação ao grupo TGE, com 10,8% a 14% de espermatozoides apresentando ambas as membranas íntegras. No teste hiposmótico, não houve diferença ($p > 0,05$) na quantidade de espermatozoides com integridade funcional da membrana nos tratamentos EDTA 0,3 e EDTA 0,5 em

relação ao grupo TGE. Não houve diferença na quantidade de espermatozoides aderidos à MPOG e na longevidade espermática (TTR) entre o grupo TGE e os tratamentos EDTA 0,3 e EDTA 0,5. Não houve diferença ($p>0,05$) na motilidade espermática entre o grupo TGE (74,70%) e o tratamento EDTA 0,3 (62,78%) porém, houve redução ($p<0,05$) para este parâmetro no tratamento EDTA 0,5 (45%), enfatizando a importância do cálcio para a motilidade espermática. A redução ou eliminação do cálcio no meio de congelamento, portanto não foi capaz de reduzir a ocorrência de criocapacitação e reação acrossomal prematura, o que melhoraria a qualidade espermática após o descongelamento. Desta forma, há outros fatores presentes no meio e/ou no processamento usado para a criopreservação que estão provocando lesão e favorecendo a ocorrência da capacitação e RA prematuras nos espermatozoides.

ABSTRACT

SOUZA, Thyara de Deco, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013.
Effects of a calcium quelant agent in the quality of frozen-thawed dog sperm.
Adviser: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

We aim to evaluate the effect of reducing the free calcium in the freezing medium, using a calcium chelating agent (EDTA) at concentrations of 0.3% and 0.5%, on the quality of frozen-thawed dog sperm. The sperm-rich fractions from three mixed breed dogs was collected by penile stimulation and evaluated for sperm progressive status, sperm motility, sperm morphology and hypoosmotic swelling test (HOST). Thereafter, it was divided into three aliquots, which were diluted in a Tris-based extender to reach a final concentration of 50×10^6 motile spermatozoa / mL, 6% glycerol and 0.5% Equex STM Paste[®] (TGE), or in the same extender with the addition of EDTA to a final concentration of 0.3% (EDTA0.3) or to a final concentration of 0.5% (EDTA0.5). After packaged in 0.25 ml straws each treatment was cooled for two hours and frozen in nitrogen vapor for 15 minutes. The samples were thawed by immersion in water bath at 37 °C for 7 seconds and evaluated as the fresh semen and for the thermoresistance test, the sperm-hen's perivitelline layer (MPOG) binding assay and for the integrity of the sperm plasma and acrosome membrane, using fluorescent probes. The calcium concentration as measured, using a spectrophotometer, in diluted fresh semen and in frozen-thawed semen. There was reduction (Duncan at 5% of significance; $p < 0.05$) in calcium concentration in both treatments EDTA0.3 and EDTA0.5 but only when EDTA was added to a final concentration of 0.5% all the free calcium present in the medium was removed. According to the fluorescent probes the reduction or the elimination of free calcium in the medium was not able to reduce the amount of frozen-thawed sperm with damaged / reacted acrosome ($p > 0.05$) compared to group TGE, with 10.8 % to 14% of sperm showing both membranes intact. There was also no difference in the number of spermatozoa bound to MOPG in the group TGE and EDTA0.3 and EDTA0.5 treatments. Although there was no difference ($p > 0.05$) in sperm motility between the TGE group (74.70%) and EDTA0.3 (62.78%) treated group, this parameter decreased ($p < 0.05$) in EDTA0.5 treatment (45%), emphasizing the importance of calcium for sperm motility. Therefore the reduction or elimination of free calcium in the freezing medium wasn't able to reduce the premature

cryocapacitaion and acrosome reaction, which would improve sperm quality after thawing. Thus there are other factors in the medium and / or processing used that are triggering injury and favoring the incidence of premature capacitation and AR in sperm.

1. INTRODUÇÃO

A população de animais de estimação, em especial os cães, vem crescendo em número e importância afetiva em todo o mundo. O crescente interesse na criação de animais de estimação reflete particularmente na cinofilia especializada, em que se observa nas últimas décadas aumento do investimento para a melhoria zootécnica dos animais, por meio de programas de melhoramento genético e principalmente da importação de reprodutores. Em 2005, a Confederação Brasileira de Kennels Clubs (CBKC) informou a importação de 483 matrizes e reprodutores, e registrou 98.119 exemplares, de 138 raças (CBKC, 2005). Esse cenário revela nos dias atuais uma grande demanda por biotecnologias de reprodução assistida que potencializem o aproveitamento de reprodutores de qualidade superior (Peña *et al.*, 2006).

As tecnologias de criopreservação de sêmen têm despertado especial interesse entre criadores de cães, uma vez que permitem o armazenamento de material genético, por período de tempo indeterminado (Wilson, 1993) e facilitam o seu transporte dispensando a movimentação dos animais e reduzindo o risco potencial de transmissão de doenças (Linde-Forsberg, 1995; Silva *et al.*, 1996). O desenvolvimento de biotecnologias de reprodução assistida em cães desperta ainda crescente interesse entre pesquisadores e estudiosos da vida selvagem, uma vez que pode ser um valioso modelo para o desenvolvimento de tecnologias em carnívoros silvestres (Gobello & Corrada, 2003; Luvoni *et al.*, 2006).

O processo de criopreservação de espermatozoides inclui várias etapas, desde a coleta, diluição e envasamento do ejaculado para o congelamento até o descongelamento e inseminação. Cada uma delas pode provocar danos aos espermatozoides e conseqüentemente reduzir o percentual de espermatozoides viáveis para reprodução (Luvoni *et al.*, 2003; Hallap *et al.*, 2006).

Diversos trabalhos com sêmen criopreservado de cães demonstraram que este processo aumenta a quantidade de espermatozoides com acrossoma danificado ou reagido, ou seja, reação acrossomal prematura (Maxwell *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1996; Rota *et al.*, 1999a; Csermak Jr., 2011). A viabilidade desses espermatozoides capacitados é limitada, pois são menos capazes de reagir ao estresse osmótico e possuem motilidade alterada reduzindo a sobrevivência (Flesch & Gadella, 2000). O mecanismo que leva a ocorrência da criocapacitação espermática não é bem

elucidado (Bailey *et al.*, 2000). Sabe-se que o cálcio é um dos principais moduladores dos processos de capacitação e reação acrossomal que ocorrem fisiologicamente (Breitbart, 2002; Witte & Schäfer-Somi, 2007). Existem também indícios do envolvimento do influxo de cálcio e de seus reservatórios intracelulares na criocapacitação e RA prematura (Szász *et al.*, 2000; Alhaider & Watson, 2009).

Neste sentido, uma opção para restringir 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, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), no meio de congelamento. Alguns testes foram conduzidos com o EDTA exercendo esta função no congelamento de sêmen canino, caprino, ovino, bovino e bubalino (Dhami & Sahni, 1993; Aisen *et al.*, 2000; Bittencourt *et al.*, 2004; Cunha & Lopes, 2005; Bittencourt *et al.*, 2008), porém os resultados ainda permanecem controversos.

Durante a pré experimentação, realizada no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (REPAAS-UFV), Ferreira (2013) observou que as concentrações de 0,1% e 0,25% de EDTA foram capazes de reduzir a concentração de cálcio no meio em relação ao controle ($p < 0,05$). Não foi observado, no entanto, diferença na quantidade de espermatozoides com acrossoma íntegro entre os três tratamentos. Provavelmente isso ocorreu por que as concentrações de EDTA testadas não reduziram as concentrações de cálcio abaixo do ideal para que a RA ocorra. No mesmo trabalho observou-se que o uso do EDTA, nas concentrações 0,1% e 0,25%, não provocou alterações na motilidade espermática. Há, portanto a necessidade de avaliar se o sequestro mais intenso de cálcio é capaz de reduzir a ocorrência de criocapacitação e reação acrossomal prematura.

Desta forma, objetivou-se por meio deste trabalho avaliar o efeito da redução da quantidade de cálcio livre no meio de congelamento, utilizando o quelante de cálcio EDTA nas concentrações de 0,3% e 0,5%, sobre a qualidade do sêmen descongelado de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiologia espermática

Os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos por meio de um processo complexo e extremamente regulado, denominado espermatogênese. Ao fim deste processo, os espermatozoides liberados no lúmen dos túbulos seminíferos apesar de já conterem toda estrutura necessária, ainda não estão aptos a fecundar um ovócito (Sirivaidyapong *et al.*, 2001). Durante a passagem pelo epidídimo, a membrana plasmática do espermatozoide sofre mudanças pela liberação, modificação e adsorção de proteínas e lipídeos, e atinge sua maturidade apenas na cauda do epidídimo (Gadella *et al.*, 2001). O espermatozoide maduro possui três regiões altamente especializadas, a cabeça, que contém o DNA, o acrossoma e uma pequena quantidade de citoplasma; a peça intermediária, onde se encontram as mitocôndrias, responsáveis pela produção de energia; e o flagelo, responsável pela motilidade espermática (Gadella *et al.*, 2001).

Apesar de estarem móveis e maduros quando são liberados dos órgãos genitais masculinos, os espermatozoides necessitam passar por um processo, nos órgãos genitais femininos, denominado capacitação para se tornarem aptos a fecundar um ovócito (Gadella, 2008). Tal processo promove uma série de modificações e reorientações nas moléculas da membrana plasmática (Yanagimachi, 1994), além de induzirem modificações no padrão de movimentação, caracterizado pelo aumento na amplitude das ondas flagelares e movimentos laterais da cabeça (Yanagimachi, 1969, Suarez *et al.*, 1983). Essas mudanças são necessárias para que o espermatozoide se ligue à matriz extracelular do ovócito e libere enzimas contidas no acrossoma para a digestão e penetração na zona pelúcida (ZP), por meio de um processo chamado reação acrossomal (RA) (Gadella & Van Gestel, 2004).

O primeiro passo para a capacitação espermática é o aumento das concentrações intracelulares dos íons Cálcio (Ca^{2+}), bicarbonato (HCO_3^-) e peróxido de hidrogênio, que ativam a produção de adenilato monofosfatase cíclico (AMPC) que por sua vez ativam a proteína kinase A (PKA) para fosforilar proteínas de membrana (Witte & Schäfer-Soni, 2007).

Em espermatozoides não capacitados, os lipídeos da membrana plasmática estão distribuídos assimetricamente ao longo da bicamada lipídica, com

predominância dos fosfolipídios colina, fosfocolinaglicerídeos e esfingomiéline na camada externa (Gadella *et al.*, 1999). Por meio da ativação da PKA, proteínas (*Scramblase*) são ativadas e promovem o deslocamento lateral dos fosfolipídios da membrana plasmática (Rathi *et al.*, 2001). Com esse deslocamento dos fosfolipídios, e o conseqüente colapso na assimetria da bicamada lipídica, as moléculas de colesterol ficam expostas à albumina presente nos órgãos genitais femininos, que é a responsável pela remoção do colesterol da membrana plasmática (Cross, 1998, Neild *et al.*, 2005). A remoção de colesterol, mediada pela albumina, representa um passo crucial para a ativação de Tirosina Kinases que promovem modificações na conformação de proteínas da membrana plasmática (MP) do espermatozoide. Além disso, com a remoção do colesterol a estrutura e a fluidez da MP fica alterada, expondo receptores de Progesterona (P_4) (Khorasani *et al.*, 2000). Este mecanismo contribui para o aumento da afinidade do espermatozoide à ZP, hipermotilidade espermática e indução da RA (Neild *et al.*, 2005).

Em espermatozoides capacitados, a ligação dos receptores às proteínas da Zona Pelúcida do ovócito ativa canais de cátions, o que resulta na despolarização da MP, aumento do pH intracelular e em um pequeno influxo de cálcio para o espermatozoide (Breitbart & Naor, 1999, Breitbart, 2002). Em seguida, canais de cálcio, que sofreram fosforização da unidade tirosina durante a capacitação e pela estimulação pela ZP, são ativados. A alcalinização intracelular em conjunto com o influxo de Ca^{2+} promovem uma elevação mais consistente das concentrações deste íon, inclusive pela mobilização de estoques intracelulares, necessária para a indução da RA (Breitbart, 2002). A liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares é capaz de induzir a RA, porém somente na presença de Ca^{2+} extracelular (Publicover & Barratt, 1999).

A elevação do Ca^{2+} intracelular é um passo crucial para a ocorrência de alterações na conformação das proteínas, presentes nas MP e MA, que formam o complexo denominado SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive). Este complexo faz parte do processo de fusão de membranas que resulta na exocitose por células secretoras em geral (Ramalho-Santos *et al.*, 2000, De Blas *et al.*, 2005; Gadella, 2008).

O cálcio é um importante modulador da capacitação e da RA, e provavelmente é uma peça chave para a permuta de informações entre o ovócito e o espermatozoide

(Darszon *et al.*, 2006). Brewis *et al.* (2001) descrevem que o cálcio possui um papel diferente na estimulação da reação acrossomal no espermatozoide canino, uma vez que aparentemente ele não possui reservas intracelulares significativas. Frações de ejaculados de cães foram testadas por Szász *et al.* (1997), submetendo-as a diferentes concentrações de íons cálcio no meio. Concentrações de cálcio extracelular acima de 100µM/L apresentaram significativo aumento de ocorrência de reação acrossomal quando comparadas às amostras tratadas com 50 µM/L.

A reação acrossomal permite que o espermatozoide hiperativado penetre na ZP, alcançando o espaço perivitelínico. A fusão com o oolema ocorre na região equatorial da cabeça do espermatozoide, área onde a RA não ocorreu e a MP ainda cobre a MA (Gadella, 2008).

2.2. Criopreservação espermática

As tecnologias de reprodução assistida, como criopreservação de gametas, inseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões possibilitam o incremento dos índices reprodutivos de plantéis e a fixação de características desejáveis em uma população, transportando apenas o material genético conservado. Desta forma, essas tecnologias têm por vantagens em relação à monta natural evitar o transporte de animais e extinguir todo o risco e dispêndio inerente a isso, além de minimizar o risco de transmissão de doenças (Villaverde, 2007). Especialmente em se tratando de cães, permitem também a reprodução de animais com dificuldade em realizar o coito, por problemas anatômicos ou comportamentais e características raciais.

O primeiro nascimento de filhotes com o uso de sêmen de cão descongelado foi relatado há quase 40 anos (Seager em 1969, citado por Stefano *et al.*, 1994). No entanto, a taxa de concepção com o uso de sêmen canino descongelado ainda é mais baixa que a observada para as outras espécies, em torno de 30 a 60% com inseminação intravaginal e 50 a 80 % com inseminação intrauterina (Fontbonne & Badinand, 1993; Wilson 1993; Silva *et al.*, 1996; Nizanski, 2005; Rota *et al.*, 2010; Uchoa *et al.*, 2012). Além disso, o tamanho da ninhada é menor ao se usar sêmen criopreservado (Linde-Forsberg & Forsber, 1993). Uma das razões para a reduzida fertilidade do sêmen criopreservado de cães é a diminuição na longevidade espermática após o descongelamento (England & Porzio, 1996; Strom *et al.*, 1997).

Apesar da morte prematura do espermatozoide descongelado poder ser um reflexo dos danos diretos causados pela criopreservação, esta fragilidade também pode ser explicada pela capacitação causada pela criopreservação (criocapacitação) que reduz o período em que o sêmen está viável (Watson, 1995; Harrison, 1996).

O processo de criopreservação inclui várias etapas, desde a coleta, envasamento e diluição da amostra para o congelamento até o descongelamento. Cada uma delas pode provocar danos aos espermatozoides e conseqüentemente reduzir o percentual de espermatozoides capazes de fertilizar um ovócito (Luvoni *et al.*, 2003; Hallap *et al.*, 2006). Em suma, os estresses sofridos pelo espermatozoide durante a criopreservação são a mudança na temperatura, o estresse osmótico e tóxico causado pela adição do crioprotetor e por fim, a formação e dissolução de cristais de gelo (Watson, 2000).

À medida que se inicia o resfriamento, particularmente entre 5 e -15°C ocorrem mudanças no estado físico dos lipídeos da membrana espermática que alteram sua fluidez, mudanças estas que são revertidas apenas parcialmente no descongelamento (Holt & North, 1984; Drobnis *et al.*, 1993). O processo de resfriamento resulta numa movimentação dos fosfolipídios da membrana celular que se agrupam em domínios contendo moléculas semelhantes e se cristalizam (Hammerstedt *et al.*, 1990; Watson, 2000). Desta forma, restam pequenas regiões contendo lipídeos na fase líquida onde proteínas ficam enclausuradas. A agregação destas proteínas pode resultar em um aumento da permeabilidade da membrana e redução da função metabólica, além de afetar a interação entre o espermatozoide e o ovócito (Amann & Pickett, 1987; Watson, 2000). O processo de resfriamento pode alterar também a conformação de fosfolipídios poliinsaturados, que normalmente possuem conformação de cone invertido, formando estruturas denominadas micelas invertidas (ou formações hexagonais). Tais estruturas podem ser transitórias, porém para certos fosfolipídios são permanentes. As formações hexagonais funcionam como canais hidrofílicos por onde podem passar íons e outras moléculas pequenas (Ohki *et al.*, 1988).

Danos inerentes ao congelamento e descongelamento podem ocorrer devido à formação e dissolução de cristais de gelo nos meios extracelular e intracelular. Em taxas de resfriamento lentas, o congelamento progressivo da água do líquido extracelular, é suficiente para provocar a saída de água das células e aumento das

concentrações dos solutos intracelulares. Neste caso, a célula fica progressivamente desidratada, porém não há formação de cristais de gelo intracelulares. Por outro lado, caso a velocidade de congelamento seja moderada a rápida, a taxa de saída de água é baixa e a água que permanece no meio intracelular congela, formando cristais de gelo grandes, que são muito danosos aos espermatozoides (Parks & Graham, 1992; Watson, 2000). Por fim, em taxas de congelamento extremamente rápidas há formação de microcristais de gelo no meio intracelular, que são menos danosos à célula. Estes microcristais, no entanto, podem sofrer recristalização se o descongelamento for lento, formando cristais maiores, deletérios à célula (Amann & Pickett, 1987). O processo de descongelamento também influencia na integridade celular e a sobrevivência da célula requer que a taxa de descongelamento esteja em concordância com a taxa de congelamento. Resumidamente, para taxas de congelamento rápidas devem-se utilizar taxas de descongelamento rápidas e vice-versa (Amann & Pickett, 1987).

O crioprotetor usado rotineiramente (glicerol) promove proteção às células das consequências da cristalização ao aumentar a fração de água não congelada no meio extracelular (Nelson *et al.*, 1999). O glicerol, no entanto pode causar alterações osmóticas desfavoráveis e possui potencial tóxico devido à capacidade de atravessar membranas celulares (McLaughlin, 1992; Gao *et al.*, 1993).

Os elementos do citoesqueleto também são sensíveis às mudanças de temperatura, podendo despolimerizar durante o resfriamento (Watson, 1995; Saunders & Parks, 1999). Spungin *et al* (1995) postularam que a despolimerização dos filamentos do citoesqueleto é um passo necessário que permite a aproximação da membrana plasmática promovendo a exocitose do acrossom e que aparentemente isso contribui para uma fusão desorganizada das membranas durante o resfriamento ou congelamento.

À medida que a temperatura cai, a formação de ATP reduz e a bomba de sódio potássio perde sua capacidade de translocar estes íons. Desta forma a proporção sódio/potássio fica alterada abrindo canais de cálcio dependentes de voltagem e permitindo o influxo de cálcio (Amann & Pickett, 1987). Apesar de não ter sido observado influxo de cálcio no espermatozoide resfriado de cães, um aumento nas concentrações intracelulares deste íon foi observado no sêmen descongelado (Quinn & White 1966; Strom Holst, *et al.*, 1998). Fisiologicamente, as concentrações de

cálcio intracelular aumentam no espermatozoide durante a capacitação, hiperativação e reação acrossomal (Suarez *et al.*, 1993; Florman, 1994). 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).

Desta forma, a criopreservação do sêmen induz a capacitação prematura dos espermatozoides e facilita a ocorrência da reação acrossomal (Cormier & Bailey, 2003). Espermatozoides criopreservados sofrem capacitação mais rapidamente em relação aos frescos, reduzindo o tempo necessário para penetração em ovócitos (Maxwell *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1996; Rota *et al.*, 1999a). A viabilidade desses espermatozoides capacitados é limitada, pois são menos capazes de reagir ao estresse osmótico e possuem motilidade alterada reduzindo a sobrevivência (Flesch & Gadella, 2000).

Espermatozoides de cães incubados em meio sem cálcio sofreram capacitação, porém não chegaram a sofrer RA (Rota *et al.*, 1999a), corroborando com os resultados de Mahi & Yanagimachi, (1978) que demonstram que a exclusão do Ca^{2+} no meio de incubação inibe a ocorrência de reação acrossomal em sêmen canino. Neste sentido, 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.

O ácido etilenodiaminotetracético (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 (Lopes *et al.*, 2004). Ao indisponibilizar o cálcio no meio extracelular, o EDTA pode, portanto, reduzir a incidência de reação acrossomal prematura (Amann & Pickett, 1987). Alguns testes foram conduzidos com o EDTA exercendo esta função no congelamento de sêmen canino, caprino, ovino, bovino e bubalino (Dhami & Sahni, 1993; Aisen *et al.*, 2000; Bittencourt *et al.*, 2004; Cunha & Lopes, 2005; Bittencourt *et al.*, 2008).

Aisen *et al.* (2000) obtiveram maiores porcentagens de espermatozoides de carneiro com acrossoma íntegro e melhor motilidade espermática, porém somente

quando o EDTA foi usado com o dissacarídeo trealose. Bittencourt *et al.* (2004) observaram aumento na motilidade espermática após o descongelamento no sêmen caprino congelado com EDTA, vindo de encontro aos resultados de outro trabalho para a mesma espécie (Bittencourt *et al.*, 2008).

Poucos trabalhos foram conduzidos usando o EDTA no meio para criopreservação de sêmen de cães (Cunha & Lopes, 2005; Ferreira, 2013). Dentre estes somente Ferreira (2013) testou o efeito do EDTA sobre a qualidade espermática, comparando duas concentrações do quelante no meio (0,1% e 0,25%) com o controle (sem EDTA). Apesar de ambas as concentrações testadas serem capazes de reduzir a concentração de cálcio no meio em relação ao controle, não foi observado diferença nas quantidades de espermatozoides com acrossoma íntegro e na motilidade espermática entre os três grupos.

2.3. Avaliação espermática

O processo de criopreservação pode provocar danos aos espermatozoides e conseqüentemente reduzir a capacidade de fertilização do sêmen (Watson, 2000; Hallap *et al.*, 2006). A avaliação da qualidade espermática, portanto, é um passo necessário para se predizer a capacidade dos espermatozoides de fecundar um ovócito (Peña-Martínez, 2004).

A fertilidade dos espermatozoides pode ser estimada por meio de testes *in vivo* e *in vitro*. Testes *in vivo*, embora decisivos na determinação da fertilidade do sêmen, requerem um grande número de animais por tratamento avaliado e estão sob a influência de outros fatores como a fertilidade da fêmea e a detecção do momento e do método ótimo para a inseminação (Eilts, 2005). Análises feitas *in vitro*, por sua vez são práticas e possibilitam a avaliação simultânea de grande número de tratamentos, entretanto, para serem conclusivas necessitam de prévia confirmação de sua correlação com a taxa de fertilidade por meio de testes *in vivo*.

Os parâmetros *in vitro* mais comumente usados para estimar a fertilidade do sêmen são a avaliação da movimentação e da morfologia do espermatozoide, da integridade e da viabilidade da membrana espermática e da sua longevidade. Esses testes estão altamente correlacionados com a viabilidade do espermatozoide (Blom, 1973; Neild *et al.*, 2000; Thomassen *et al.*, 2006; Defoin *et al.*, 2007). Outros parâmetros não comumente empregados na avaliação de rotina, como a capacidade

de ligação e de penetração dos espermatozoides, podem ser de grande importância como métodos complementares permitindo aperfeiçoar os métodos de criopreservação.

2.3.1. Sondas fluorescentes

As sondas fluorescentes foram definidas por Tera & Nagano (2008) como moléculas que reagem especificamente com moléculas biológicas de forma a induzir uma modificação concomitante de suas propriedades fotoquímicas, como a intensidade de fluorescência e a excitação/emissão de comprimentos de onda. Desta forma, as sondas fluorescentes podem ser usadas na avaliação da integridade e funcionalidade da célula espermática, permitindo a avaliação de estruturas e compartimentos específicos destas (Peterson *et al.*, 1974; Halangk, *et al.*, 1984), uma vez que a fluorescência pode ser alterada por mudanças específicas do estado de moléculas (Haugland, 2001).

A membrana plasmática desempenha um papel importante na funcionalidade do espermatozoide (Amann & Pickett, 1987). Neste sentido, a avaliação das injúrias causadas à membrana permite investigar os passos dos protocolos de manipulação, congelamento e descongelamento responsáveis por estes danos. As sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI), Hoechst 33258 (H258) e 33342 (H342), SYBR-14 e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) são amplamente usadas para esta finalidade.

O iodeto de propídeo tem afinidade pelo DNA, porém é capaz de atingir o núcleo somente quando a MP está lesionada. Uma vez dentro da célula, liga-se ao material genético, emitindo fluorescência vermelha (Arruda *et al.*, 2003). Já a sonda fluorescente H342 também possui afinidade pelo DNA, porém emite fluorescência azul ao atravessar a membrana intacta e sofrer modificações em sua estrutura dependentes do metabolismo da membrana plasmática (Celeghini *et al.*, 2010). Desta forma, esta sonda pode ser usada como contracorante do IP.

As lecitinas conjugadas como a *Psium sativum* (PSA) ou *Arachis hypogaea* (PNA) (Silva & Gadella, 2006) são amplamente usadas na avaliação da integridade do acrossoma e se ligam a carboidratos de glicoproteínas que estão exclusivamente localizados no acrossoma. As lecitinas são impermeáveis ao acrossoma intacto, no entanto a reação acrossomal ou acrossoma danificado permite a entrada destas

macromoléculas, porém para a visualização em microscopia de fluorescência elas devem estar conjugadas a fluoresceínas, como o isotocianato de fluoresceína (FITC) (Baker *et al.*, 2004) ou R-ficoeritrina (RPE) (Gadella & Harrison, 2000). O PNA se liga a glicoproteínas da membrana acrossomal e o PSA se liga a componentes enzimáticos da matriz na luz do acrossoma, se ligando ao açúcar α -manosidade, encontrado no conteúdo acrossomal (Cross & Meizel, 1989; Silva & Gadella, 2006). Segundo Almadaly *et al.* (2012) o PNA, no entanto é mais específico na ligação com estruturas do acrossoma em relação ao PSA.

A combinação de sondas fluorescentes permite a avaliação simultânea de diferentes compartimentos celulares (Celeghini *et al.*, 2008, 2010; Nascimento *et al.*, 2008). A combinação das sondas IP, H342 em associação com a sonda FITC-PSA tem sido usada de forma satisfatória na avaliação das membranas plasmática e acrossomal de cães (Csermak Jr., 2011; Ferreira, 2013), com a definição de quatro populações espermáticas: espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras (II), com membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (IL), com membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (LI) e com membranas plasmática e acrossomal lesadas (LL). Esta combinação, no entanto ainda não foi usada em associação com a sonda FITC-PNA para esta espécie.

2.3.2. Teste de ligação

A interação entre os gametas envolve o reconhecimento de receptores presentes na zona pelúcida do ovócito pelas proteínas de ligação correspondentes na superfície do espermatozoide (Sinowatz *et al.*, 2003; Rath *et al.*, 2005). Esse contato inicial induz a reação acrossomal permitindo a exposição dos receptores secundários presentes na membrana do espermatozoide e a liberação de enzimas contidas no acrossoma para a digestão e penetração na Zona Pelúcida (Rath *et al.*, 2005).

A capacidade do espermatozoide de se ligar à zona pelúcida é um evento crítico que culmina na fertilização (Mayenco-Aguirre & Pérez-Cortes, 1998). Este evento é dependente de diversos fatores, dentre eles, a motilidade espermática e fluidez das membranas espermáticas. Deste modo, os testes de interação entre gametas são uma opção para avaliar a qualidade espermática. Neste tipo de ensaio podem ser usados ovócitos homólogos ou heterólogos.

A partir de ensaios realizados com humanos desde os anos 80, o teste de ligação entre gametas homólogos mostrou-se eficaz para distinguir indivíduos

pertencentes a grupos férteis, inférteis e sub-férteis (Liu & Baker, 1993; Oehninger, *et al.*, 1997; Bastiaan *et al.*, 2002). Mais tarde experimentações feitas em outras espécies como, bovinos (Herrera *et al.*, 2005), caprinos (Santos, 2010), equinos (Meyers *et al.*, 1996), e no cão (Ström Holst *et al.*, 2000) mostraram a eficiência do ensaio também para estas espécies.

Apesar da confiabilidade depositada no teste de ligação, a obtenção dos ovócitos, ou do número adequado de animais, pode ser um fator limitante, bem como seu custo mais elevado (Rota *et al.*, 1999b; Tardif *et al.*, 1999). Ainda em relação aos ovócitos, a variação individual de qualidade pode gerar viés na interpretação dos resultados (Eilts, 2005; Santos, 2010). Em outros casos, como na espécie humana, os entraves são também de caráter ético. Todavia, uma das grandes vantagens deste tipo de teste é que ele permite quantificar a ligação, que seria o ponto crucial mais próximo à fecundação. Este cenário motivou pesquisadores a buscar uma maior padronização das variáveis envolvidas com o uso de substratos alternativos.

Barbato *et al.* (1998) testaram a capacidade ligante de ejaculados de galo com diferentes fertilidades à membrana perivitelina do ovo de galinha (MPOG), sendo possível detectar a população de animais sub-férteis (Barbato *et al.*, 1998). Outros pesquisadores usaram a técnica em mamíferos, obtendo também resultados promissores (Amorim, 2008; Santos, 2010; Csermak Jr., 2011; Araujo, 2012; Garay, 2012). O uso da membrana perivitelina tem algumas vantagens em relação aos ovócitos uma vez que permite o teste de diferentes partidas de sêmen sobre um mesmo substrato, ou seja, diferentes fragmentos de uma mesma membrana, minimizando a variação embutida ao teste pelo “efeito fêmea”. Além disso, a membrana é de obtenção mais fácil e menos dispendiosa que o ovócito.

A técnica descrita por Barbato *et al.* (1998) é usada como referência para o desenvolvimento do teste de ligação à MPOG em espécies de mamíferos (Amorim, 2008; Santos, 2010). Resumidamente, a técnica consiste na lavagem da MPOG para retirada da gema do ovo e na secção da mesma em fragmentos de 1cm². Cada fragmento de MPOG é então transferido para um tubo de cultura, onde é incubado, em estufa com 95% de umidade e 5% de CO₂, com amostra do sêmen. Após o período de incubação, o fragmento de MPOG é lavado para a retirada de espermatozoides fracamente ligados, estendido em uma lâmina de vidro e coberto por lamínula para contabilização de seis campos aleatórios. No entanto esta

metodologia não previne dobramentos da MPOG durante a incubação, e uma vez que a ligação dos espermatozoides não é uniforme ao longo da MPOG, com o uso de campos aleatórios pode-se superestimar ou subestimar os resultados de ligação.

Em vista destes entraves, pesquisadores buscaram desenvolver um dispositivo que permita a padronização de uma área estendida de MPOG (Csermak Jr., 2011; Araujo, 2012; Garay, 2012). O material desenvolvido consiste em um halo de silicone vazado com diâmetro interno de quatro milímetros e diâmetro externo de seis milímetros, onde a MPOG é depositada e sobre o qual outro halo, com diâmetro interno de seis mm é encaixado. Desta forma, a membrana permaneceu fixa e com a área a ser lida devidamente esticada e totalmente exposta, permitindo a contagem do total de espermatozoides ligados à área de $12,56\text{mm}^2$ de MPOG.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram usados três cães machos adultos, sem raça definida, oriundos do canil municipal de Viçosa-MG. Os cães foram mantidos em baias individuais de 9m² recebendo como alimentação ração para cães e com água *ad libitum*.

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (Processo: 84/2012).

3.2. Coleta e processamento do sêmen

O sêmen foi coletado por estimulação manual do pênis. Em dois dos animais realizaram-se cinco coletas por animal enquanto que no terceiro realizaram-se seis coletas, respeitando um intervalo de dois dias entre as coletas para cada cão.

Para a coleta de sêmen foi usado um tubo plástico com base cônica de 15 mL, graduado e transparente (*falcon*®), mantido em banho-maria, constituído de um 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).

Imediatamente após a coleta, retirou-se 50µL de sêmen para diluição em um tubo plástico de 1,5mL (*eppendorf*®) contendo 200µL de solução fixadora *karnovsky* (Karnovsky, 1965), 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 em defeitos maiores e menores (Blom, 1973).

Em seguida, a FR foi diluída na proporção 1:1 no meio de manutenção (MM; 24g/L de TRIS, 14 g/L de ácido cítrico, 8 g/L de glicose, 2 g/L de amicanina, 200 g/L de gema de ovo; Nutricell®, SP-Brasil) e uma alíquota de 10µL 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 zero a cinco, sendo zero imobilidade e cinco maior intensidade de movimento e a motilidade espermática foi estimada a partir do porcentual de espermatozoides móveis.

Uma alíquota de 5µL de sêmen foi diluída em tubo plástico de 1,5mL (*eppendorf*®) contendo 495µL de água destilada (Proporção 1:100) e após

homogeneização esta diluição foi usada para o cálculo da concentração espermática, em câmara de *Neubauer*. Para calcular a concentração de espermatozoides móveis por mL multiplicou-se a concentração espermática pela motilidade espermática. O sêmen foi então padronizado para 100×10^6 espermatozoides móveis por mL, por diluição em MM. Dessa diluição foram retiradas as alíquotas para a quantificação da concentração de cálcio e para a realização dos demais testes no sêmen fresco.

Para o teste hiposmótico (HOST), retirou-se 20 μ L do sêmen diluído, que foi adicionado a um tubo plástico de 1,5mL (*eppendorf*®) contendo 250 μ 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 μ 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 total de espermatozoides reativos foi corrigido excluindo-se da população total a parcela com as mesmas características contabilizadas no teste de patologia (Melo & Henry, 1999).

A concentração de cálcio foi determinada em espectrofotômetro E-225D (Celm®) a 370 nanômetros, usando o reagente de cálcio InVitro®, no sêmen fresco (diluído em MM a 100×10^6 espermatozoides móveis por mL) e no sêmen descongelado, em cada uma dos tratamentos. Para isso, uma solução contendo 1mL do Reagente 1 e 1mL do Reagente 2 foi levada ao espectrofotômetro para tarar a leitura e posteriormente 20 μ L de sêmen foi acrescentado à solução e levada ao espectrofotômetro para a leitura.

3.3. Criopreservação

Para a criopreservação, o sêmen na concentração de 100×10^6 espermatozoides móveis por mL foi dividido em três alíquotas as quais foram rediluídas na proporção 1:1 (V:V) respectivamente no meio controle (TGE), no meio de congelamento EDTA 0,3 e no meio de congelamento EDTA 0,5. Obteve-se, portanto concentrações finais de 50×10^6 espermatozoides móveis/mL, com 6% de glicerol e 0,5% de Equex STM Paste® (TGE, EDTA 0,3 e EDTA 0,5), e com 0,3% de EDTA (EDTA 0,3) ou

0,5% de EDTA (EDTA 0,5). O sêmen foi diluído conforme descrito abaixo e envasado em palhetas de 0,25mL.

TGE: TRIS-Glicerol-Equex (12% de glicerol, 1% de Equex STM Paste[®] diluídos em MM);

EDTA 0,3: meio contendo 0,6% de EDTA (12% de glicerol, 1% de Equex STM Paste[®], 0,6% de EDTA diluídos em MM);

EDTA 0,5: meio contendo 1% de EDTA (12% de glicerol, 1% de Equex STM Paste[®], 1% de EDTA diluídos em MM).

Para o resfriamento foi usada a metodologia descrita por Bueno *et al.* (2001) modificada (Deco-Souza *et al.*, 2013). 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 uma hora e depois deste tempo de equilíbrio, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido. Foi usado um suporte onde as palhetas foram postas horizontalmente e permaneceram a uma altura de 10 cm sobre uma lâmina de 3 cm de nitrogênio líquido em caixa isotérmica, por 15 minutos (Deco-Souza *et al.*, 2013). Em seguida, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido.

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 da mesma forma que o sêmen fresco e pelos testes de termorresistência, de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (MPOG) e quanto à integridade das membranas plasmática e do acrossoma por coloração com sondas fluorescentes.

3.4. Teste de termorresistência

Depois de descongelado, aguardou-se dois minutos de incubação a 37°C em banho Maria para o início da avaliação espermática pelo teste de termorresistência. Para tal, durante uma hora, a intervalos de 15 minutos, uma alíquota de sêmen foi retirada para avaliação do vigor e da motilidade espermática, conforme descrito no sêmen fresco.

3.5. Teste de ligação à membrana perivitelina do ovo de galinha

Para o teste de ligação de espermatozoides à membrana perivitelina de ovo de galinha (MPOG) o sêmen descongelado foi diluído em meio de manutenção para uma concentração de $0,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Para tal utilizou-se ovos frescos (postura realizada no mesmo dia da experimentação) e não embrionados, conforme descrito por Csermak Jr. (2011). A preparação da membrana perivitelina teve início na separação entre a clara e a gema do ovo. Após este procedimento, a gema intacta *foi* acondicionada em placa de Petri e seccionada com uma tesoura oftálmica. Por esse orifício parte da gema *foi* succionada utilizando-se seringa de 10 mL, para então ser lavada com soro fisiológico até a completa remoção de gema, restando somente a membrana perivitelina. A membrana limpa *foi* então transferida para outra placa de Petri contendo meio TALP modificado (Costa, 1997), onde se fez uma última lavagem e a montagem da membrana em um suporte de silicone. A superfície interna da membrana *foi* acondicionada sobre um halo de silicone vazado com diâmetro interno de quatro milímetros e diâmetro externo de seis milímetros, a superfície de membrana que ultrapassava os limites do halo externo foi então cortada com uma tesoura oftálmica. Posteriormente, outro halo, com diâmetro interno de 6mm foi encaixado sobre o primeiro, o que manteve a membrana fixa e com a área a ser lida devidamente esticada e totalmente exposta (Figura 1).

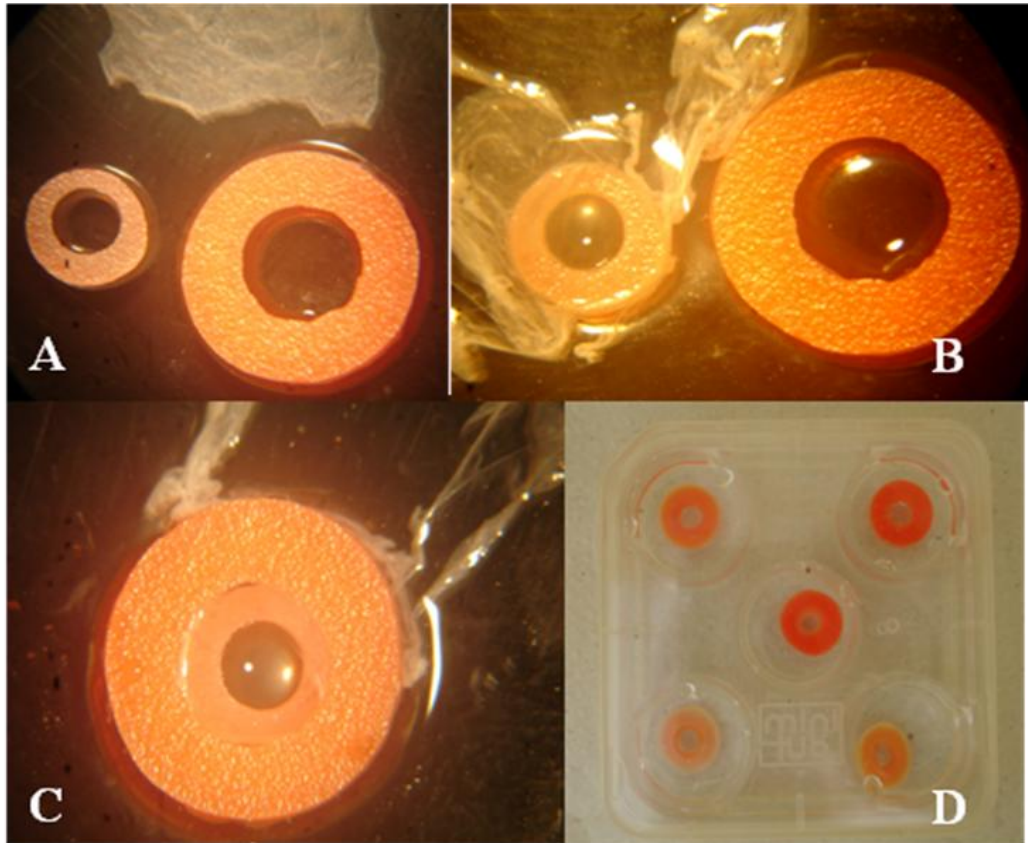


Figura 1: Preparo da membrana perivitelina de ovo de galinha para teste de ligação com espermatozoides. Suporte usado para a realização do teste (A); membrana sobreposta ao halo de 4 mm de diâmetro interno (B); suporte pronto para ser incubado com os espermatozoides (C); suportes dispostos em placa de cultivo (D).

Os suportes contendo a MPOG foram colocados em poços de placa de cultivo com 500 μL de meio de cultivo TCM 199 modificado (Costa 1994; Anexo 1), para incubação em estufa a 38°C com pressão atmosférica de 5% de CO_2 e 95% de umidade relativa por 30 minutos, visando a estabilização das células. Após esse período cada um dos poços recebeu 20 μL de sêmen a $0,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Para coloração dos espermatozoides, após 30 minutos de incubação, foram adicionados 100 μL da sonda fluorescente Hoechst 33342 e após 50 minutos do início da incubação 20 μL de Iodeto de Propídio, perfazendo 60 minutos de incubação. Estes procedimentos foram realizados em ambiente escuro e sobre placa aquecedora a 38 °C. Ao término de incubação, as membranas foram lavadas quatro vezes em meio Talp-Hepes modificado (Costa *et al.*, 1997). Em seguida foi efetuada a montagem das lâminas para a visualização em microscópio de epifluorescência triplo DAPI/FITC/TEXAS - red (Motic[®], Canadá). Todas as células espermáticas ligadas à MPOG foram contadas.

3.6. Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal

Para o teste de integridade de membrana plasmática e acrossomal foram utilizadas as sondas fluorescentes: Hoechst 33342 (H342; Molecular Probes H1399) indicando membrana plasmática íntegra, Iodeto de Propídio (IP; Sigma P4170) como indicador de membrana plasmática lesada e isotiocianato de fluoresceína conjugado com a lecitina *Arachis hypogaea* (Fit-C PNA; Sigma L7381) indicando membrana acrossomal lesada.

Previamente à realização das análises, foram preparadas soluções estoque para cada uma das sondas usadas, a partir das quais foram preparadas as soluções de trabalho a serem usadas para a avaliação dos espermatozoides (Anexo 2). As soluções estoque do iodeto de propídeo (25 mg/mL) e do Hoechst 33342 (25 mg/mL) foram preparadas pela diluição de 100 mg da sonda em 4 mL de DMSO (Sigma F3510) e armazenadas a -20°C em frasco âmbar (Celeguini et al., 2010). A solução de trabalho do iodeto de propídeo foi preparada na concentração de 2 mg/mL por diluição em DPBS (Sigma d8662) e armazenada a -20°C em frasco âmbar (Celeguini et al., 2010). Para o preparo da solução de trabalho do H342, por sua vez, dilui-se 8 µL da solução estoque em 992 µL de DPBS (200µg/mL), para ser armazenada a -20°C em frasco âmbar. Por fim, a solução estoque do FITC-PNA foi preparada pela diluição de 1 mg FITC-PNA em 1 mL DPBS e a solução de trabalho (10,31µg/mL) pela diluição de 10 µL da solução estoque em 960 µL solução de citrato de sódio 3% em DPBS, ambas foram armazenadas a 4 °C em frasco âmbar (Adaptado de Queiroz, 2003).

Para a realização do teste, em um tubo plástico âmbar de 1,5mL (*ependorf*®) adicionou-se 5µL de sêmen descongelado, 30µL de Hoechst e 20 µL FITC-PNA, após 10 minutos de incubação a 37°C adicionou-se 2 µL de Iodeto de Propídio. Após 13 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 HBO 100W (Motic®, Canadá) equipado com filtro triplo DAPI/FITC/TEXAS - red no aumento de 1000 vezes. Contaram-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 de cães identificadas pela associação das sondas Hoescht 33342 (H342), Iodeto de Propídeo (IP) e FitC – PNA (FitC).

Populações	H342	IP	FitC
Membrana plasmática e membrana acrossomal íntegras (II)	+	-	-
Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal lesada (IL)	+	-	+
Membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (LI)	-	+	-
Membrana plasmática lesada membrana acrossomal lesada (LL)	-	+	+

Adaptado de Csermak Jr, 2011.

3.7. Análises estatísticas

Usou-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. Os dados que não atenderam às premissas de normalidade e/ou homogeneidade foram transformados e reavaliados. Para as variáveis que atenderam as premissas para avaliação paramétrica (ANOVA), foi usado o teste Duncan a 5% de significância para a comparação das médias entre os tratamentos do sêmen descongelado e entre esses e o sêmen fresco. Para variáveis que não permitiram análise paramétrica e para o dado qualitativo vigor, foi usado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis a 5% de significância. As análises foram realizadas utilizando o software SAEG 9.1 (2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente experimento, foram usados apenas os ejaculados com motilidade espermática maior que 70% e vigor maior que 3 (CBRA, 1998). No sêmen fresco, a média da motilidade espermática foi de 85,3% (Tabela 2), menor que o verificado por Uchoa et al. (2012) e por Santana et al. (2013) (97% e 93,4%, respectivamente), porém maior que o verificado por Alhaider & Watson (2009), que observaram motilidade média de aproximadamente 75%. A média do total das patologias espermáticas no sêmen fresco foi 33,3%, em grande parte relacionada com a presença de defeitos menores (24,8%; Tabela 2), que não estão diretamente relacionados com infertilidade (Blom, 1973). Neste sentido, considerou-se que as amostras frescas usadas tiveram boa qualidade para serem processadas para criopreservação.

Tabela 2: Características espermáticas (média \pm desvio padrão) de sêmen fresco de cão.

Características espermáticas	Sêmen fresco
Vigor	4,3 \pm 0,5
Motilidade (%)	85,3 \pm 7,4
Patologias totais (%)	33,3 \pm 22,6
Defeitos maiores (%)	8,5 \pm 9,4
Defeitos menores (%)	24,8 \pm 17,9
Hiposmótico	68,0 \pm 21,1

No presente experimento, a concentração média de Ca^{2+} no sêmen diluído em MM para uma concentração de 100×10^6 espermatozoides móveis por ml, dos cães foi de 23,0 mg/dL. No presente trabalho, o EDTA foi usado com o objetivo de quelar o cálcio livre no meio de manipulação e congelamento, indisponibilizando-o para o espermatozoide. Ambas as concentrações de EDTA testadas foram capazes de reduzir a concentração de cálcio extracelular livre ($p < 0,05$), com média de 22,7 mg/dL no sêmen diluído no meio TGE (sem adição do quelante de cálcio) e 1,5 mg/dL no sêmen diluído no meio EDTA 0,3 (Tabela 3). Porém, somente quando EDTA foi adicionado para a concentração final de 0,5% foi possível indisponibilizar todo o cálcio presente no meio (Tabela 3).

Em condições fisiológicas, após a ligação com a zona pelúcida, o espermatozoide sofre reação acrossomal (RA), liberando as enzimas necessárias à penetração espermática (Breitbart 2002; Witte & Schäfer-Somi, 2007; Costa *et al.* 2010). Este processo depende da mobilização de reservatórios extra e intracelulares do cálcio (Hewitt & England, 1998; Szász *et al.*, 2000; Alhaider & Watson, 2009). Desta forma, de acordo com Mahi & Yanagimachi (1978), a exclusão do Ca^{2+} no meio de incubação inibe a ocorrência de reação acrossomal em sêmen canino. O meio diluente usado para o congelamento de sêmen contendo TRIS, Citrato e gema de ovo é amplamente usado no congelamento de sêmen de cães (Futino *et al.*, 2010; Rota *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2013), porém, Ferreira (2013) observou que a concentração de cálcio no meio contendo estes componentes foi cerca de dez vezes maior que a concentração deste íon no ejaculado.

No presente experimento, a coloração pela sonda fluorescente FITC-PNA, demonstrou uma média de 59,0% a 63,7% de espermatozoides com acrossoma íntegro nos tratamentos (II e LI; Figura 2). No entanto, apenas de 10 a 14% dos espermatozoides tinham ambas as membranas, plasmática e acrossomal, íntegras (II; Tabela 3). A criopreservação do sêmen induz a capacitação prematura (criocapacitação) dos espermatozoides e facilita a ocorrência da reação acrossomal (Cormier & Bailey, 2003). Embora o mecanismo que leve a criocapacitação espermática não seja bem elucidado, os processos de resfriamento e, em maior escala, congelamento, promovem alterações na capacidade do espermatozoide em regular a entrada e saída de íons cálcio, fator desencadeador da RA (MacLaughlin *et al.*, 1994; Bailey *et al.*, 2000; Szász *et al.*, 2000).

Tabela 3: Médias e desvios padrão do vigor, motilidade espermática, concentração de cálcio extracelular, Teste hiposmótico, patologia, coloração por sondas fluorescentes e Teste de ligação à membrana perivitelina do ovo de galinha, do sêmen de cães criopreservado em meio com EDTA (EDTA 0,3 e EDTA 0,5) e sem EDTA (TGE). (n=18).

	Meio de congelamento		
	TGE	EDTA 0,3	EDTA 0,5
Ca (mg/dL)**	22,7 ± 3,1 ^a	1,5 ± 1,3 ^b	0,00 ± 0,00 ^c
Vigor (1-5)*	3,0 ± 0,5 ^{bc}	3,1 ± 0,4 ^b	2,4 ± 0,6 ^c
Motilidade (%)*	64,7 ± 14,2 ^b	62,8 ± 19,2 ^b	45,0 ± 20,6 ^c
Hiposmótico (%células íntegras)**	42,7 ± 19,8 ^b	49,6 ± 19,8 ^b	46,5 ± 21,1 ^b

Patologia total (%)**	59,6 ± 18,2 ^a	49,8 ± 23,0 ^a	50,4 ± 20,2 ^a
Defeitos maiores (%)**	31,1 ± 17,0 ^a	22,3 ± 17,6 ^a	26,4 ± 19,8 ^a
Defeitos menores (%)**	28,50 ± 8,5 ^a	27,4 ± 15,3 ^a	23,9 ± 10,0 ^a
LI (%)**	45,0 ± 13,9 ^a	52,1 ± 21,3 ^a	49,7 ± 24,6 ^a
II (%)**	14,0 ± 11,4 ^a	10,8 ± 9,6 ^a	14,0 ± 13,9 ^a
LL (%)**	40,7 ± 10,6 ^a	36,9 ± 16,1 ^a	36,3 ± 21,3 ^a
IL (%)**	0,3 ± 0,6 ^a	0,3 ± 0,6 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
NMPOG**	57,0 ± 39,9 ^a	51,7 ± 48,9 ^a	41,9 ± 37,6 ^a

* Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma linha são diferentes ($p < 0,05$) pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

**Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma linha são diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

LI: espermatozoides com membrana plasmática (MP) lesionada e membrana acrossomal (MA) íntegra; II: espermatozoides com MP e MA íntegras; LL: espermatozoides com MP e MA lesionadas; IL: espermatozoides com MP íntegra e MA lesionada; NMPOG: número de espermatozoides ligados à membrana perivitelina do ovo de galinha.

No presente experimento a redução (EDTA 0,3) ou a eliminação (EDTA 0,5) do cálcio livre no meio não foram capazes de reduzir a quantidade de espermatozoides descongelados com acrossoma lesado/reagido (LL e IL; $p > 0,05$) em relação ao grupo TGE (Tabela 3). Foi demonstrado que o cálcio no meio reduz a viabilidade espermática e afeta a morfologia do acrossoma durante o resfriamento (Bailey & Buhr, 1995). Porém ao usar o EDTA no meio de criopreservação, para indisponibilizar este íon, pesquisadores não observaram aumento da quantidade de espermatozoides com acrossoma íntegro (não reagido) após o descongelamento (Aisen *et al.*, 2000; Bittencourt *et al.*, 2008). Semelhantemente, Ferreira (2013) ao testar as concentrações de 0,1% e 0,25% do EDTA no meio de congelamento de cães, não observou diferença para a integridade acrossomal nos meios usados em relação ao controle (sem EDTA).



Figura 2: Populações de espermatozoides distintas em ejaculado de cão doméstico pela associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio (IP), Hoechst 33342 (H342) e FITC-PNA. Espermatozoide com membrana plasmática e acrossomal íntegras (II); espermatozoide com membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (IL); espermatozoide com membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (LI); espermatozoide com membrana plasmática e acrossomal lesada (LL).

De acordo com o teste hiposmótico, no presente trabalho não houve diferença ($p > 0,05$) na quantidade de espermatozoides com integridade da membrana plasmática nos tratamentos EDTA 0,3 e EDTA 0,5 em relação ao grupo TGE (Tabela 3). Assim a diminuição ou a retirada do cálcio livre do meio de congelamento não foi capaz de prevenir lesões na membrana plasmática. 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 na fêmea (Parks & Graham, 1992). Desta forma, a funcionalidade normal da membrana é essencial para que ocorra a fertilização, sendo um importante parâmetro seminal a ser avaliado. Por meio do teste hiposmótico é possível obter uma avaliação da integridade da membrana plasmática. A integridade da MP está correlacionada com a taxa de prenhez e a porcentagem de espermatozoides móveis e morfologicamente normais no ejaculado (Neildet *al.*, 2000).

No presente experimento, não houve diferença na quantidade de espermatozoides ligados à MPOG, após uma hora de incubação, entre o grupo TGE e os tratamentos EDTA 0,3 e EDTA 0,5. Desta forma, possivelmente a redução ou a retirada do cálcio livre no meio não preveniu a ocorrência de capacitação induzida pelo processo de criopreservação. Depois de sofrerem capacitação os espermatozoides estão aptos para se ligar ao ovócito (Gadella, 2008). Rota et al. (1999a) e Pérez et al. (1996) observaram que no sêmen fresco o pico de capacitação ocorre mais lentamente que o sêmen descongelado, indicando que este necessita de menos tempo para se ligarem ao ovócito. Neste sentido, é esperado que as amostras de sêmen com maior incidência de criocapacitação se liguem mais rapidamente em relação a amostras em que esta reação não ocorreu.

No presente trabalho, não houve diferença para os defeitos maiores, e para os defeitos totais, entre o grupo TGE e os tratamentos EDTA 0,3 e EDTA 0,5 (Tabela 3), demonstrando que a presença do EDTA no meio não provocou alterações estruturais no espermatozoide, mesmo quando foi usado em concentrações acima das testadas em outras espécies e no cão. Ao avaliar o efeito da adição do EDTA a 0,1% no meio de congelamento de sêmen de caprino Bittencourt et al. (2004) observaram aumento na quantidade de defeitos maiores em relação ao meio sem EDTA, porém em outro trabalho com a mesma espécie esta diferença não foi detectada (Bittencourt *et al.*, 2008). Ferreira (2013) também não detectou aumento de patologias em sêmen de cão congelado com meio contendo EDTA nas concentrações de 0,1% e de 0,25%.

Como demonstrado da Tabela 3 não houve diferença ($p > 0,05$) para a motilidade espermática entre o grupo TGE e o tratamento EDTA 0,3 (64,7% e 62,8%, respectivamente). Houve, no entanto redução ($p < 0,05$) da motilidade espermática no tratamento EDTA 0,5 (45,0%), em que o cálcio foi totalmente indisponibilizado, resultado já esperado uma vez que o cálcio é necessário para a manutenção da motilidade espermática (Lee *et al.*, 1996). Desta forma, são necessárias experimentações testando se a adição do cálcio após o descongelamento nos meios contendo EDTA é capaz de reverter os efeitos causados à motilidade espermática pela indisponibilização deste íon.

Após sofrer capacitação os espermatozoides possuem viabilidade limitada, uma vez que são menos capazes de reagir ao estresse osmótico e possuem motilidade alterada o que reduz sua longevidade (Flesch & Gadella, 2000). No presente

experimento, a longevidade dos espermatozoides foi avaliada por meio da motilidade espermática observada após 60 minutos de incubação (T60; Tabela 4). Por meio deste teste, foi possível verificar a ineficácia da retirada do cálcio livre no meio de congelamento em aumentar a sobrevivência dos espermatozoides, uma vez que não houve diferença ($p > 0,05$) na longevidade espermática entre o grupo TGE e os tratamentos EDTA 0,3 e EDTA 0,5 (Tabela 4).

Tabela 4: Média \pm Desvio padrão do vigor e da motilidade espermática, aferidos após o descongelamento (T0) e a intervalos de 15 minutos, do sêmen de cães criopreservado em meio com EDTA (EDTA 0,3 e EDTA 0,5) e sem EDTA (TGE). (n=18).

Tempo de incubação	TGE	E0,3	E0,5
Vigor T0*	3,0 \pm 0,5 ^{a,b}	3,1 \pm 0,44 ^a	2,4 \pm 0,6 ^b
Motilidade T0**	64,7 \pm 14,2 ^a	62,8 \pm 19,3 ^a	45,00 \pm 20,7 ^b
Vigor T15 min*	2,6 \pm 0,6 ^a	2,6 \pm 0,6 ^a	1,7 \pm 0,9 ^b
Motilidade T15 min**	49,2 \pm 17,3 ^a	47,2 \pm 21,4 ^a	28,1 \pm 20,5 ^a
Vigor T30 min*	2,00 \pm 0,72 ^a	1,83 \pm 0,84 ^a	1,25 \pm 0,94 ^a
Motilidade T30 min**	33,3 \pm 18,1 ^a	34,7 \pm 24,0 ^a	21,1 \pm 20,3 ^a
Vigor T45 min*	1,3 \pm 1,07 ^a	1,3 \pm 1,0 ^a	0,8 \pm 0,9 ^a
Motilidade T45 min*	20,6 \pm 21,2 ^a	19,4 \pm 18,2 ^a	11,1 \pm 15,7 ^a
Vigor T60 min*	0,9 \pm 1,0 ^a	0,9 \pm 1,0 ^a	0,4 \pm 0,8 ^a
Motilidade T60 min*	11,4 \pm 13,7 ^a	13,9 \pm 17,5 ^a	5,0 \pm 12,0 ^a

* Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma linha são diferentes ($p < 0,05$) pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

**Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma linha são diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Ducan.

No presente trabalho, a quelação parcial ou total do cálcio, por meio da adição do EDTA, não foi capaz de prevenir a reação acrossomal causada pela criopreservação, com redução da motilidade espermática no meio em que o cálcio foi totalmente indisponibilizado. Alguns testes foram conduzidos com a adição do EDTA no meio de congelamento de sêmen de mamíferos (Aisen *et al.*, 2000; Bittencourt *et al.*, 2004; Bittencourt *et al.*, 2008). Aisen *et al.* (2000) obtiveram maiores porcentagens de espermatozoides de carneiro com acrossoma íntegro e melhor motilidade espermática, porém esta condição somente foi observada quando o EDTA foi usado em associação com o dissacarídeo trealose. Bittencourt *et al.* (2004) observaram aumento na motilidade espermática após o descongelamento no sêmen caprino congelado com EDTA, vindo de encontro com os resultados em outro trabalho para a mesma espécie, que não encontrou diferença na motilidade espermática do meio contendo este quelante de cálcio (Bittencourt *et al.*, 2008).

As divergências encontradas na literatura a respeito do efeito da quelação do cálcio no meio de congelamento estão relacionadas com as diferentes composições dos meios e dos processamentos de criopreservação, que afetam o espermatozoide de maneiras distintas. Além disso, os demais trabalhos que usaram o EDTA no meio de congelamento não mediram a quantidade de cálcio após o uso do quelante, desta

forma não é possível determinar ao certo se o efeito deletério ou benéfico encontrado foi realmente devido à alteração na concentração do cálcio no meio. Essas divergências demonstram também que a indisponibilização do cálcio nem sempre é desejável para o espermatozoide. Na verdade, a ausência deste íon é deletéria para esta função, uma vez que o cálcio é essencial para a movimentação do espermatozoide como demonstrado pela redução da motilidade espermática após o descongelamento no sêmen de cão criopreservado no meio sem cálcio (EDTA 0,5; Tabela 3). Neste sentido, provavelmente há outros fatores presentes no meio e/ou no processamento usado no presente trabalho que estão provocando lesão ou favorecendo a ocorrência da capacitação e RA prematuras nos espermatozoides criopreservados.

5. CONCLUSÕES

A indisponibilização parcial e total do cálcio, por meio da adição do quelante de cálcio (EDTA), nas concentrações de 0,3% e 0,5%, não previne a lesão das membranas acrossomal e plasmática, assim como não favoreceu a longevidade espermática e a capacidade ligante dos espermatozoides à membrana perivitelina do ovo de galinha. A indisponibilização total do cálcio reduz a motilidade espermática após o descongelamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 2000;53:1053-1061.
- Alhaider AK & Watson PF. Cryopreservation of dog semen: The effect of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. *Anim. Reprod. Sci.* 2009;110:147-161.
- Almadaly E, El-Kon I, Heleil B, Fattouh el-S, Mukoujima K, Ueda T, Hoshino Y, Takasu M, Murase T. Methodological factors affecting the results of staining frozen-thawed fertile and subfertile Japanese Black bull spermatozoa for acrosomal status. *Anim. Reprod. Sci.* 2012;136:23– 32.
- Amann RP & Pickett BW. Principles of Cryopreservation and Review of Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. *Equine Vet. Sci.* 1987;7(3), 145 – 173.
- Amorim EAM. *Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen.* 2008. Tese (Doutorado em Zootecnia), Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. 174p.
- Araujo GR. *Uso de sondas fluorescentes e ensaio de ligação a ovócitos heterólogos e a membrana perivitelínica de ovo de galinha (*Gallus gallus*) para a avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).* 2012. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária), Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 64f.
- Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Liu IKM. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta. Scient. Vet.* 2003; 31(Suplemento):226-227.
- Bailey JL, Buhr MM. Regulation of internal Ca²⁺ by chilled bull and boar spermatozoa. *Cryobiology* 1995;32:259-269.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.*, 2000; 21(1):01-07.

- Baker SS, Thomas M, Thaler CD. Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. *J. Androl* 2004; 25:744-751.
- Barbato GF, Cramer PG, Hammerstedt RH. A Practical In Vitro Sperm-Egg binding assay that detects subfertile males. *Biol. Reprod.* 1998; 58:686-699.
- Bastiaan HS, Menkveld R, Oehninger S, Franken D R. Zona pellucida induced acrosome reaction, sperm morphology, and sperm-zona pellucida binding assessments among subfertile men. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2002; 19, 329-334.
- Bittencourt RF, Ribeiro Filho AL, Lima MCC, Alves SGG, Vasconcelos MF, Biscarde CE, Leal LS, 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.* 2008; 45(4):305-312.
- Bittencourt RF, Ribeiro AL, Santos ADF, Furst R, Teixeira RBS, Chalhoub M, Portela AP, Alves SGG, Almeida AK, Guimarães JD. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. *Ciênc. Anim. Bras.* 2004; 5(1):27-32.
- Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Veterinaermed.* 1973; 25:383 – 391.
- Breitbart H. Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *J. Reprod. Immun.* 2002; 53:151–159.
- Breitbart H, Naor Z. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reviews Rep.* 1999; 4:151–159.
- Brewis IA, Morton IE, Moore HDM, England GCW. Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Molec. Reproduc. and Develop.* 2001; 60:491-497.
- Bueno R, Costa EP, Guimarães JD, Valentim FM. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. I – Efeito do meio diluidor. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2001; 53(3).

- CBKC - Confederação Brasileira de Kennes Klubs. *Relatório anual de atividades cinófilas*. 2005. Disponibilidade e acesso: <<http://www.cbkc.org.br>> Acessado em 5 de fevereiro de 2013.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal* (2ed). Belo Horizonte, CBRA, 1998.
- Celeghini ECC, Nascimento J, Raphael CF, Andrade AFC, Arruda RP. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2010; 62(3):536-543.
- Celeghini, ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 104:119-131.
- Chirinéa VH, Martins MIM, Souza FF, Tebet JM, Papa FO, Lopes MD. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. *Ci. Anim. Bras.* 2006; 7(4):407-415.
- Cormier N, Bailey JL. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation. *Biol. Reprod.* 2003; 69:177-185.
- Costa EP. Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos bovinos *in vitro*. 155f. 1994. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Costa EP, Vale Filho VR, Nogueira JC, SA WF, Costa AHA. Técnica simplificada para o desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 1997; 49(4):425-432.
- Costa MZ, Oliveira LZ, Resende MV, Lucio AC, Perini AP, Miguel MCV, Lima VFMH. Induction of the acrosome reaction test to *in vitro* estimate embryo production in Nelore cattle. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2010; 62(4):771-777.
- Cross NL, Meizel S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.* 1989; 41:635-641.

- Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998); 59:7-11.
- Csermak Jr. AC. *Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozóide do cão Canis (Lupus familiaris) à membrana perivitelina do ovo de galinha (Gallus gallus) como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen*. 2011. 72 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Cunha ICN & Lopes MD. Efeito de três diferentes diluidores sobre o sêmen canino submetido a dois protocolos de descongelamento. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2005; 42(5):372-380.
- Darszon A, Lopez-Martinez P, Acevedo JJ, Hernandez-Cruz A, Trevino CL, T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium* 2006; 40:241–252
- De Blas GA, Roggero CM, Tomes CN, Mayorga LS. Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol.* 2005; 3:1801-1812.
- Deco-Souza T, Paula TAR, Costa DS, Costa EP, Barros JBG, Araujo G, Carreta-Jr M. Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). *Pesq Vet Bras.* 2013; 33(4):512-516.
- Defoin L, Granados A, Donnay I. Analysing Motility Parameters on Fresh Bull Semen Could Help to Predict Resistance to Freezing: A Preliminary Study. *Reprod. Dom. Anim.* 2008; 43(5):606-661.
- Dhami AJ & Sahni KLSO. Effect of extenders, additives and deep freezing on the leakage of lactic dehydrogenase from cattle and buffalo spermatozoa. *Indian J. Anim. Sci.* 1993; 63(3):251-256.
- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy T, Overstreet JW, Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zool.* 1993; 265(4):432 – 437.
- Eilts BE. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology* 2005; 64:685-691.

- England GCW, Porzio P. Comparison of the quality of frozen thawed and cooled rewarmed dog semen. *Theriogenology* 1996; 46:165–171.
- Ferreira LBC. *Bioquímica do plasma seminal e efeito do EDTA adicionado ao meio de congelamento do sêmen de cão*. 2013. 52f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária), Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- Flesch FM & Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Bioch. Bioph. Acta*. 2000; 1469(3):197 – 235.
- Florman HM. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev. Boil.* 1994; 165:152-164.
- Fontbonne A, Badinand F. Estudios on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1993; 47:531-532.
- Futino DO, Mendes MCB, Matos WNL, Mondadori RG, Lucci CM. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.* 2010; 45:214–220.
- Gadella BM. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 107:229–236.
- Gadella BM, Miller NGA, Colenbrander B, van Golde LMG, Harrison RAP Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Mol. Reprod. Dev.* 1999; 53:108-125.
- Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. Capacitation and acrosome reaction in equine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2001; in press: 11-28.
- Gadella BM & Van Gestel RA. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim. Reprod. Sci.* 2004; 82–83:307–319.

- Gadella BM & Harrison RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipids transbilayer behavior in the plasma membrane. *Development* 2000; 127:2407-2420.
- Gao GY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol. Reprod.* 1993; 49:112–123.
- Garay RM. *Uso de sondas fluorescentes para avaliação seminal de ejaculado de gato do mato pequeno (Leopardus tigrinus) e ensaio de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (Gallus gallus) como ferramenta de predição de fertilidade espermática.* 2012. 57f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária), Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- Gobello C & Corrada Y. Biotechnology in canine reproduction: an update. *Acta Vet.* 2003; 23(1):30-37.
- Halangk W, Frank K, Bohnensack R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullene jakulaten. *Archiv Exper Vet. Med. Leipzig.* 1984; 38(1):105-114.
- Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez- Martine H. Usefulness of a Triple Fluorochrome Combination Merocyanine 540 / Yo-Pro 1 / Hoechst 33342 in Assessing Membrane Stability of Viable Frozen-Thawed Spermatozoa from Estonian Holstein AI Bulls. *Theriogenology* 2006; 65:1122 – 1136.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What we Ask Them to Survive. *J. Androl.* 1990; 11(1):73 – 87.
- Harrison RAP. Capacitation mechanisms, and role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996; 8:581–594.
- Haugland RP. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Molecular Probes 2001.

- Herrera C, Brogliatti G, Cavia R, Conde P, Revora M, Pasqualini RS. CASA sperm parameters and their relation with in vitro fertilization. Proc 15th Int Congress. *Anim. Reprod. - Brazil* 2005; 2:411p.
- Hewitt DA & England GCW. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Ani. Reprod. Sci.* 1998; 51:321–332.
- Holt WV, North RD. Partially Irreversible Cold-Induced Lipid Phase Transitions in Mammalian Sperm Plasma Membrane Domains: Freeze-Fracture Study. *J. Exp. Zoo.* 1984; 230(3):473 – 483.
- Karnovisky MJ. A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cel. Bio.* 1965; 27:137-138.
- Khorasani AM, Cheung AP, Lee CYG. Cholesterol inhibitory effects on human sperm-induced acrosome reaction. *J. Androl.* 2000; 21:586–594.
- Kumi-Diaka J. Subjecting canine semen to the hipo-osmotic test. *Theriogenology* 1993; 39:1279-1 289.
- Lee C, Anderson M, Chien YW. Characterization of in-vitro spermicidal activity of chelating agent against human sperm. *J. Pharm. Sci.* 1996; 8(6): 649-654.
- Linde-Forsberg C, Forsberg M. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47:313–323, Suppl.
- Linde-Forsberg C. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Sem. Vet. Med and Surg. (Small Animal)* 1995; 10(1):48-58.
- Liu DY, Baker HWG. Inhibition of acrosin activity with a Trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biol. reprod.* 1993; 48:340-48.
- Lopes HP, Siqueira Jr JF, Elias CN. Substâncias químicas empregadas no preparo de canais radiculares. In: *Endodontia: biologia e técnica*. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2004; p. 535-579.

- Luvoni GC, Kalchschmidt E, Leoni S, Ruggiero C. Conservation of feline semen – part I: cooling and freezing protocols. *J. Feline Med. Surg.* 2003; 5:203-208.
- Luvoni GC, Chigioni S, Beccaglia M. Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. *Reprod. Dom. Ani.* 2006; 14:286-290.
- Mahi C.A, Yanagimachi R. Capacitation, acrosome reaction, and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. *Gamete Res.* 1978; 1:101–109.
- Maxwell WMC, Catt SL, Evans G. Dose of fresh and frozen–thawed spermatozoa for in vitro fertilization of sheep oocytes (Abstract). *Theriogenology* 1996; 45:261.
- Mayenco-Aguirre AM, Pérez Cortés AB. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology* 1998; 50:195-204.
- Mclaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. *J. Reprod. Fert.* 1992; 95:749-754.
- Maclaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR. Adenosine triphosphate and motility characteristics of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 1994; 17:19–23.
- Melo MIV & HENRY M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 1999; 51(1):71-78.
- Meyers SA, Liu IKM, Overstreet JW, Vadas S, Drobnist EZ. Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: comparisons between fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 1996; 46:1268-1277.
- Nascimento J, Andrade AFC, Raphael CF, Andrade AFC, Alonso MA, Celeguini ECC, Arruda RP. Effects of sperm concentration and volume of straws on motion characteristics and plasma, acrosomal and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 2008; 28:351-358.

- Neild DN, Gadella BM, Agüero A, Stout TAE, Colenbrander B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 2005; 89:47–56.
- Neild DM, Chaves MG, Flores M, Miragaya MH, Gonzalez E, Agüero A. The HOS Test and its Relationship to Fertility in the Stallion. *Andrology* 2000; 32(6):351 – 355.
- Nelson KL, Crichton EG, Doty L, Volenec DE, Morato RG, Pope CE, Dresser BL, Armstrong DL, Loskutoff NM. Heterologous and Homologous Fertilizing Capacity of Cryopreserved Felid Sperm: a Model for Endangered Species. (Abstract). *Theriogenology* 1999; 51:290.
- Nizanski W. Comparisons of results of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with frozen-thawed semen. *EJPAU* 2005; 8(4):1-6. Acessado em: <http://www.ejpau.media.pl/volume8/issue4/art-12.html>
- Oehninger S, Franken D, Kruger T. Approaching the next millennium: how should we manage andrology diagnosis in the intracytoplasmic sperm injection era? *Fertil. Steri.*, 1997; 67:434-436.
- Ohki S, Doyle D, Flanagan TD, Hiu, SW, Mayhew E. (Ed.) *Molecular Mechanisms of Membrane Fusion*. 1988. New York: Plenum.
- Parks JE & Graham JK. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992; 38: 209-222.
- Peña FJ, Núñez-Martínez I, Morán JM. Semen technologies in dog breeding: an update. *Reprod. Dom. Ani.* 2006; 41:21-29 Supp. 12.
- Pérez LJ, Valcárcel A, de las Heras MA, Moses D, Baldassarre. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 1996; 46:131-140.
- Peterson RN, Silverstain K, Freund M. A rapid fluorometry method for the determination of DNA in human semen. *J. Reprod. Fertil.* 1974; 41:485-488.

- Publicover SJ & Barratt CLR. Voltage-operated Ca²⁺ channels and the acrosome reaction: which channels are present and what do they do? *Hum. Reprod.* 1999; 14:873–879.
- Queiroz, V.S. *Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (Leopardus pardalis Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides.* 2003. 132f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.
- Quinn PJ, White IG. The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *J. Reprod. Fertil* 1966; 12:263–270.
- Ramalho-Santos J, Moreno RD, Sutovsky P, Chan AW, Hewitson L, Wessel GM, Simerly CR, Schatten G. SNAREs in mammalian sperm: possible implications for fertilization. *Dev. Biol.* 2000; 223:54-69.
- Rath D, Töpfer-Petersen E, Michelmann HW, Schwartz P, Ebeling S. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 63:352-362.
- Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2001; 65:462-470
- Rijseelaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, Kruif A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology* 2005; 64:706-719.
- Rota A, Peña AI, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 1999a; 57(3-4):199-215.
- Rota A, Iguer-Ouada M, Verstegen JP, Linde-Forsberg C. Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology* 1999b; 51:1045-1058.

- Rota A, Milani C, Romagnoli S, Zucchini P, Mollo A. Pregnancy and conception rate after two intravaginal inseminations with dog semen frozen either with 5% glycerol or 5% ethylene glycol. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 118:94–97.
- SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.
- Santana M, Batista M, Alamo D, González F, Niño T, Cabrera F, Gracia A. Influence of cool storage before freezing on the quality of frozen–thawed semen samples in dogs. *Reprod. Dom. Anim.* 2013; 48:165–170.
- Santos MCR. *Avaliação de métodos alternativos para análises da capacidade de ligação do espermatozóide caprino e estudo do polimorfismo no gene Izumo em caprino, devido à ação do congelamento do sêmen.* 2010. 54f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- Saunders KM, Parks JE. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 1999; 61:178–187.
- Silva LDM, Onclin K, Lejeune B, Verstegen JP. Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet. Rec.*, 1996; 138:154-157.
- Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006; 65:958-978.
- Sinowatz F, Wessa E, Neumüller C, Palma G. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reprod. Dom. Anim.* 2003; 38:141-146.
- Sirivaidyapong S, Bevers MM, Gadella BM, 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. Dev.* 2001; 58:451–459.

- Spungin B, Margalit I, Breitbart H. Sperm Exocytosis Reconstructed in a Cell Free System. Evidence for the Involvement of Phospholipase C and Actin Filaments in Membrane Fusion. *J. Cell Sci.* 1995; 108(6):2525-2535.
- Stefano B, Zambellin D, Bergonzoni ML. L'inseminazione artificiale nel cane con seme congelato. *Praxis Vet.* 1994; 14(2):12-18.
- Strom B, Rota A, Linde-Forsberg C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 1997; 48:247–256.
- Strom Holst B, Rota A, Andersen Berg K, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H, Canine sperm head damage after freezing–thawing: ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod. Dom. Anim.* 1998; 33:77–82.
- Ström Holst B, Larsson B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. Evaluation of chilled and frozen–thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J. Reprod. Fertil.* 2000; 119:201–206.
- Suarez SS, Katz DF, Overstreet JW. Movement Characteristics and Acrosomal Status of Rabbit Spermatozoa Recovered at the Site and Time of Fertilization. *Bio. Reprod.* 1983; 29:1277-1287.
- Szász F, Cheng FP, Marks A, Colenbrander B, Solti L. Induction of acrosome reaction in dog sperm by calcium ionophore (Abstract). *Acta Vet. Hung.* 1997; 45(2):177-187.
- Szász F, Sirivaidyapong S, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Colenbrander B, Solt L, Gadella BM. Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol. Reprod. Dev.* 2000; 55:289-298.
- Tardif S, Laforest JP, Cormier N, Bailey JL. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology* 1999; 52:447-459.
- Terai T & Nagano T. Fluorescent probes for bioimaging applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008; 12: 515–521.

- Thomassen R, Sanson G, Krogenaes A, Fougner JA, Andersen Berg K, Farstad W. Artificial Insemination with Frozen Semen in Dogs: a Retrospective Study of 10 Years Using a Non-Surgical Approach. *Theriogenology* 2006; 66(6-7):1645-1650.
- Uchoa DC, Silva TFP, Mota Filho AC, Silva LDM. Intravaginal artificial insemination in bitches using frozen/thawed semen after dilution in powdered coconut water (ACP-106c). *Reprod. Dom. Anim.* 2012; 47(Suppl. 6):289–292.
- Villaverde AISB. *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.
- Watson PF. The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61:481-492.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995; 7:871–891.
- Wilson MS. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J. Rep. Fert.* 1993; 47:307-311, Suppl.
- Witte TS & Schäfer-Somi S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2007; 102:181-193.
- Yanagimachi R. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 1969; 18:275-286.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD. (Eds.), *Physiology of Reproduction*, second ed. Raven Press, Ltd., New York, 1994. pp. 189–317.

ANEXOS

ANEXO I: Composição dos meios usados de manipulação e cultivo para o teste de ligação à membrana perivitelina do ovo de galinha.

TCM-199

<u>Componente</u>	<u>Quantidade</u>
TCM-HEPES	2,0 mL
NaHCO ₃	2,0 mL
BSA	800 µL
Lactato de Cálcio	500 µL
Piruvato	500 µL
PEN-Estrepto	200 µL
H ₂ O tridestilada	14 mL

Fonte: Costa (1994)

TALP-HEPES

<u>Componentes</u>	<u>mM</u>	<u>Quantidade</u>
NaCl	114,0	1,6655 g
KCl	3,2	0,0596 g
NaHCO ₃	2,0	0,0420 g
NaH ₂ PO ₄	-	0,0120 g
Lactato de Sódio (60%)	10,0	0,219 mL
C ₆ H ₁₂ O ₆ (glicose)	5,0	0,2252 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	2,0	0,0735 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O a 50% (ESTÉRIL)	0,5	51 µL
HEPES	10,0	0,5957 g
Vermelho Fenol	-	0,0025 g
Pelicilina G sódica (1.659 UI/0,001g)	-	0,0150 g (25.000 UI)
H ₂ O tridestilada (qsp)	-	250 mL

Bavister *et al.*, (1983), modificado por Costa, 1997

ANEXO II: Diluições dos Fluoróforos para preparo das soluções estoque e de trabalho das sondas fluorescentes

Iodeto de Propídio

Solução estoque

25 mg de PI + 1 mL de DMSO (25 mg/mL)

Solução trabalho (2 mg/mL)

80 µL da solução estoque de PI (25 mg/mL) + 920 µL de DPBS

Armazenar em freezer, no escuro.

Hoescht 33342

Solução estoque

100 mg H342 + 4 mL de DMSO (25 mg/mL)

Solução trabalho (200µg/mL)

8 µL da solução estoque (25 mg/mL) + 992 µL de DPBS

Armazenar a – 20°C no escuro

FITC-PNA

Solução de estoque (1mg/mL)

1mg FITC-PNA + 1mL DPBS

Solução trabalho (10,31µg/mL)

10 µL da solução estoque + 960 µL de citrato de sódio 3% em DPBS

Armazenar a 4 °C, no escuro.