

GRAZIELLA DE SOUZA CORREIA VASCONCELOS

**USO DE SONDAS FLUORESCENTES E DO ENSAIO DE LIGAÇÃO
À MEMBRANA PERIVITELINA DE OVO DE GALINHA (*Gallus gallus*)
PARA A AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES FRESCOS E
DESCONGELADOS DE CÃO (*Canis lupus familiares*)**

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
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

V331u
2015
Vasconcelos, Graziella de Souza Correia, 1981-
 Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação à
 membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) para a
 avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de cão (*Canis lupus familiares*) / Graziella de Souza Correia
 Vasconcelos. – Viçosa, MG, 2015.
 ix, 49f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Tarcizio Antônio Rêgo de Paula.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cão - Reprodução. 2. *Canis lupus familiares*. 3. Cão -
Espermatozoides - Análise. 4. Sêmen - Criopreservação.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

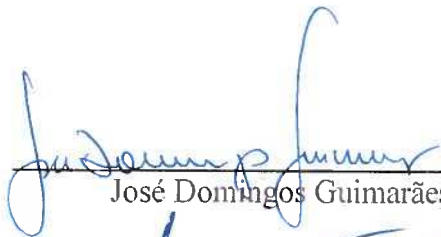
CDD 22. ed. 636.7

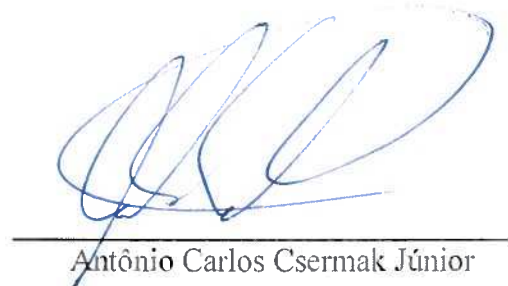
GRAZIELLA DE SOUZA CORREIA VASCONCELOS

**USO DE SONDAS FLUORESCENTES E DO ENSAIO DE LIGAÇÃO À
MEMBRANA PERIVITELINA DE OVO DE GALINHA (*Gallus gallus*) PARA A
AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES FRESCOS E DESCONGELADOS DE
CÃO (*Canis lupus familiares*)**

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: 19 de novembro de 2015.


José Domingos Guimarães


Antônio Carlos Csermak Júnior


Cláudio César Fonseca


Rebeca Marques Mascarenhas


Tarcízio Antônio Rego de Paula
(Orientador)

A meu querido avô Lauriano (in memoriam),
meu eterno protetor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força interior para superar as dificuldades e me apontar os caminhos nas horas incertas.

A meus pais e meu irmão, por todo o amor dedicado, ensinando-se sempre sobre a importância da construção e coerência dos meus valores.

Aos meus queridos avós, Lauriano (in memoriam) e Nise, pelo amor dedicado e que me faz fortalecida sempre.

A minha família, tio e primos, da qual muito me orgulho. Obrigada pelo verdadeiro sentimento de amor nos laços que nos mantêm sempre unidos.

Ao meu orientador, o Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula, por todas as oportunidades. Obrigada pela compreensão, paciência e tolerância, mas principalmente pelos ensinamentos durante toda essa caminhada, desde o mestrado.

Aos professores, José Domingos Guimarães, Eduardo Paulino e Cláudio Fonseca, pela sempre disposição em esclarecer quaisquer dúvidas e por todos os ensinamentos durante a jornada da pós-graduação.

Ao meu co-orientador Antônio Carlos Csermak Jr. Carrilão, obrigada pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária, em especial à Rose, pelo carinho e pela disposição nas inúmeras vezes que necessitei de auxílio.

Aos amigos do REPAAS-UFV (Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Animais Silvestres): Letícia, Leanes, Mayra, Vinicius, Soraia e todos os estagiários, pela força durante todo o trabalho. Agradecimento especial ao Gê, pelo tempo despendido e pelos ensinamentos referentes ao experimento.

Ao meu noivo, por ser tão amoroso e paciente, principalmente durante as minhas ausências.

Aos irmãos que Deus colocou em minha vida e que escolhi para conviver: Natasha, Filipe e Rafael. Muito obrigada pela amizade sincera, pelos momentos felizes e pelo suporte no período mais difícil.

Aos amigos da República K-Zona Rural: Renan, Daniel, Nelcino, Tibil, Goianim e Bernardo, pelas melhores memórias de Viçosa.

A minhas filhas de quatro patas, Greta e Janis, e a todos os animais que direta ou indiretamente contribuíram para meu aprendizado e formação.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Família Canidae	1
1.2. Cão doméstico	2
1.2.1. Origem	2
1.2.2. Domesticação	2
1.2.3. Importância do cão como animal de companhia e mercado pet	3
1.3. Reprodução Assistida	4
1.3.1. Cães x Espécies ameaçadas	4
1.3.2. Criopreservação de sêmen	6
1.3.3. Metodologias para análise de sêmen	8
1.3.4. Uso de sondas fluorescentes	9
1.3.5. Testes de ligação.....	11
2. Material e Métodos.....	13
2.1. Animais	13
2.2. Colheita, processamento e avaliação do sêmen	14
2.3. Criopreservação do sêmen	15
2.4. Sondas fluorescentes	16
2.5. Ensaio de ligação entre os espermatozoides e a membrana perivitelina	16
2.6. Análises estatísticas	18
3. Resultados e Discussão	18
4. Conclusões	30
5. Referências Bibliográficas	31
ANEXOS.....	47

RESUMO

VASCONCELOS, Graziella de Souza Correia, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2015. **Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação à membrana perivitelina do ovo de galinha (*Gallus gallus*) para a avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de cão (*Canis lupus familiares*).** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Análises seminais por meio da associação de sondas fluorescentes possibilitam a avaliação dos diversos compartimentos da célula espermática, simultaneamente, oferecendo um prognóstico mais acurado frente ao caráter subjetivo de alguns testes de rotina. Neste estudo foi utilizada a associação de três sondas fluorescentes com objetivo de avaliar a integridade da membrana plasmática (iodeto de propídio e Hoechst 33342) e o potencial de membrana mitocondrial (MitoTracker red), em sêmen fresco e descongelado de cão. Os resultados obtidos foram comparados aos resultados dos testes de rotina. Todos os testes demonstraram capacidade em detectar queda de qualidade seminal pós-descongelamento. A associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio (IP), Hoechst 33342 (H33342) e MitoTracker red (CMXRos) mostrou-se eficaz na distinção de diferentes populações de espermatozoides em ejaculados descongelados de cão doméstico. Foram distintas 4 populações: IC (membrana plasmática íntegra e com potencial de membrana mitocondrial), IS (membrana plasmática íntegra e sem potencial de membrana mitocondrial), LC (membrana plasmática lesada e com potencial de membrana mitocondrial) e LS (membrana plasmática lesada e sem potencial de membrana mitocondrial). Esta associação permitiu também quantificar e qualificar as injúrias causadas às membranas plasmáticas das células espermáticas, pelo processo de congelamento/descongelamento, nesta espécie. Foi observada correlação ($p < 0,05$) entre a coloração das sondas fluorescentes e a avaliação da motilidade espermática e teste hiposmótico. Desta forma, sugere-se a inclusão da combinação de sondas fluorescentes nos protocolos de análise de sêmen, como teste complementar aos testes convencionais, tornando mais precisa a avaliação das injúrias à célula

espermática desta espécie. Entretanto, nem os testes de rotina e nem as sondas fluorescentes são hábeis em predizer a capacidade do espermatozoide de ligar-se ao ovócito, evento crucial para a fecundação. Assim, faz-se importante a adoção de testes de ligação entre espermatozoides e ovócitos nas pesquisas referentes à avaliação dos protocolos de congelamento/descongelamento do sêmen. Embora o status metabólico dos ovócitos, assim como o efeito fêmea, limitem a exatidão das interpretações, tem-se buscado substratos de ligação mais homogêneos e de mais fácil obtenção. Neste contexto, a membrana perivitelina do ovo de galinha (MPOG) tem se demonstrado eficiente na avaliação da capacidade de ligação do sêmen em diversas espécies. O teste de ligação de espermatozoides à MPOG apresenta comportamento semelhante aos resultados dos testes de rotina da avaliação do sêmen, assim como os testes com as sondas fluorescentes, apresentando diferença quando comparados sêmen fresco e sêmen descongelado ($p < 0,05$). Neste estudo, o teste hiposmótico correlacionou-se positivamente com o número de espermatozoides ligados à membrana perivitelina da gema do ovo de galinha. O comportamento da MPOG e das sondas, entre os tratamentos, demonstraram sensibilidade da membrana em distinguir sêmens de diferentes potenciais de ligação ($p < 0,05$) nesta espécie.

ABSTRACT

VASCONCELOS, Graziella de Souza Correia, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2015. **Use of fluorescent probes and assay of binding to the perivitelline layer of the chicken egg (*Gallus gallus*) for evaluate fresh and frozen-thawed dog (*Canis lupus familiares*) sperm.** Adviser: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Seminal analysis by means of the association of fluorescent probes allows for the simultaneous evaluation of several compartments of the spermatid cell, offering a more accurate prognostic when compared to the subjective character of some routine tests. In this study, the association of three fluorescent probes was used with the goal of evaluating the integrity of plasma membrane (propidium iodide and Hoechst 33342) and mitochondrial membrane potential (Mito Tracker red), in dog semen, both fresh and frozen. The attained results were compared to those of routine tests. All tests showed the capacity of detecting a drop in seminal quality after being unfrozen. The association of the fluorescent probes propidium iodide (PI), Hoechst 33342 (H33342) and Mito Tracker red (CMXRos) showed efficiency when differentiating sperm populations in the frozen semen of domestic dogs. There were four distinct populations: IC (intact plasma membrane and with mitochondrial membrane potential), IS (intact plasma membrane without mitochondrial membrane potential), LC (injured plasmatic membrane with mitochondrial membrane potential) and LS (injured plasmatic membrane without mitochondrial potential). This association also allows the quantification and qualification of the injuries caused on the sperm cell by the freezing/thawing process in this species. A correlation was observed between the coloring of the fluorescent probe and the evaluation of sperm motility and hypo-osmotic swelling test ($p < 0,05$). However, the attained results with the probes showed a higher precision rate when detecting injuries to the sperm cells thus suggesting the inclusion of the combination of fluorescent probes in semen analysis protocols, once evidence shows greater efficiency when compared to routine tests. Consequently, the inclusion of the combination of the fluorescent probes in the semen analysis is suggested as a complementary test, making the

evaluation of the injuries to the spermatid cell of this species more precise. However, neither the routine tests nor the fluorescent probes are capable of predicting spermatozoon's capability to bind to the oocyte, an crucial event to fecundation. Therefore, it is important to introduce binding assays between spermatid cells and oocytes in the research that refer to the evaluation of the freezing/ thawing semen protocols. Although the oocytes metabolic status, like the "female effect", limit the accuracy of the interpretations, substrate binding that are more homogeneous and easier to obtain are being pursued. In this context, the perivitelline layer of the egg yolk has demonstrated to be efficient in evaluating the binding capacity of sperm in a number of species. The binding tests of sperm to the MPOG shows a behavior that is similar to the results obtained from semen's routine evaluation tests, as well as the test with the fluorescent probes, presenting a difference when comparing fresh with unfrozen semen ($p < 0,05$). In this study, the hypoosmotic test correlated positively to the number of spermatozoon connected to the perivitelline layer of the egg yolk. The behavior the MPOGs and that of the probes, between other treatments, demonstrated the membrane's sensibility in distinguishing semen of different potential binding ($p < 0,05$) in this species.

1. Introdução

1.1. Família Canidae

A família Canidae envolve um grande grupo de mamíferos predadores pertencentes à ordem carnívora que compreende duas subordens: a Pinnipedia, composta pelos carnívoros aquáticos, e a Fissipedia, composta pelos carnívoros terrestres. Os carnívoros terrestres subdividem-se ainda em dois grupos: o Arctoidea e o Canoidea, grupo este bastante heterogêneo, onde se encontra o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*), espécie utilizada no presente estudo. Dentro da família Canidae são reconhecidos 16 gêneros e 36 espécies atuais, amplamente distribuídas pelo mundo, desde os desertos até as regiões árticas (IUCN, 2004).

Os canídeos apresentam adaptações anatômicas bem características e particulares relacionadas ao seu hábito cursorial, como os membros alongados e semirrígidos terminando em membros torácicos e membros pélvicos digitígrados. Usualmente, apresentam patas anteriores contendo cinco dígitos, e posteriores quatro dígitos, todos acompanhados por garras bem desenvolvidas, substituindo as garras retráteis encontradas em outros carnívoros. A cabeça e o focinho são geralmente alongados e as orelhas eretas. Os músculos envolvidos na captura, contenção e mastigação da presa são bem desenvolvidos, principalmente o músculo masseter. A dentição apresenta incisivos não especializados, molares preensores, pré-molares afiados, também denominados dentes carnassiais, e finalmente, longos e fortes caninos utilizados para conter e desestabilizar a presa (DYCE et al., 2004).

Socialmente, o hábito dos canídeos pode variar desde aqueles que vivem em grupos, apresentando complexa organização social e capturando grandes presas, como o lobo cinzento e o cachorro-vinagre, àqueles de hábito solitário, predando pequenos animais. Apesar de possuírem a dentição adaptada à dieta carnívora, algumas espécies apresentam-se onívoras e, de maneira oportunista, variam sua dieta de acordo com a disponibilidade de alimento, como por exemplo, o lobo Guará, que também se alimenta de insetos e vegetais. Quanto à reprodução, geralmente é observada uma gestação ao ano, durando em média de 63 dias, composta por mais de um filhote que recebem cuidados parentais e de outros membros do grupo (IUCN, 2004).

1.2. Cão doméstico

1.2.1. Origem

Apesar da estreita relação homem-cão, as informações acerca da ancestralidade do cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) ainda é um tema bastante controverso e de caráter hipotético, devido à grande variabilidade morfológica desta espécie. Registros fósseis apontam que a família Canidae desenvolveu-se na América do Norte, espalhando-se para a América do Sul, Ásia e Europa, porém não há registro fóssil de cães domésticos além de 15 ou 20 mil anos atrás (VILÀ et al., 1997; WAYNE & VILA, 2001; SAVOLAINEN et al. 2002).

Semelhanças morfológicas e fisiológicas entre os cães domésticos e os lobos, assim como análises evolutivas pelo mapeamento e comparação do DNA mitocondrial destas espécies, confirmaram uma semelhança genética com apenas 0,2 % de diferenciação. Diante desta observação, o cão doméstico foi considerado descendente direto do lobo cinzento (*Canis lupus*), hipótese mais aceita até hoje. Deste modo, em 1997 foi proposta a reclassificação taxonômica pelo Smithsonian Institute e pela American Society of Mammalogists, considerando o cão doméstico como subespécie do lobo, reclassificando-o de *Canis familiaris* para *Canis lupus familiaris* (WAYNE & VILA, 2001; LEONARD et al., 2002; WILSON & REEDER, 2005).

1.2.2. Domesticação

Os primeiros registros fósseis destes canídeos estiveram quase sempre associados a fósseis humanos, demonstrando que o processo de domesticação provavelmente ocorreu de forma concomitante ao surgimento da espécie, onde homens e cães passaram a conviver não mais como competidores por um nicho, mas como parceiros (SERPEL, 1995; GRANDJEAN & VAISSAIRE, 2001; JOHNSTON et al., 2001; SCHELLING et al., 2005).

De acordo com a teoria de que o cão doméstico derive diretamente do lobo selvagem, supõe-se que populações destes animais, ao longo de suas gerações, teriam se dividido em duas: uma daqueles ditos propriamente selvagens e outra daqueles que se

adaptaram ao convívio humano. Ao fixar-se, constituindo pequenas aldeias, abandonando o estilo nômade e adotando o sedentário, o homem passa a produzir e acumular resíduos alimentares que serviam de alimento aos lobos, até então, também nômades. A proximidade entre essas duas espécies permitiu que elas cooperassem entre si e que populações de lobos cada vez menos tímidas, dispostas a sobreviver a partir das sobras a um baixo custo energético, passassem a ser domesticadas, visando o trabalho e alimentação (LOBÃO, 1992; SERPEL, 1995; COPPINGER & COPPINGER, 2002).

Ao tornar-se parte da comunidade humana, o cão passou, ao longo dos anos, por intensa seleção de indivíduos e cruzamentos programados para se obter destaque em características como a criação de portes e habilidades específicas (caça, luta, guarda faro ou pastoreio). A maior consequência disto foi a criação de mais de 400 raças, existentes hoje, com grande diversidade morfológica ao redor do mundo (WILSSON & SUNDGREN, 1997; MASCARENHAS et al., 2006).

1.2.3. Importância do cão como animal de companhia e o mercado pet

O papel do cão na sua relação com o homem vem passando por diversas alterações ao longo da sua evolução, tornando-o cada vez mais importante nas atividades humanas. A importância dada a esses animais decorre dos inegáveis benefícios obtidos a partir do vínculo afetivo estabelecido com eles, influenciando na vida e na saúde humana de diversas formas. Segundo a Abinpet – Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação – o Brasil tem a segunda maior população de cães do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (ABINPET, 2015). Dados apresentados pela PNS – Pesquisa Nacional de Saúde – realizada em 2013 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em parceria com o Ministério da Saúde, constataram que a população de cães em domicílios brasileiros é de 52,2 milhões de indivíduos, dando uma média de 1,8 cães por domicílio. Ainda segundo o IBGE, quase metade das residências brasileiras (44,3%) possui pelo menos um cão, o equivalente a 28,9 milhões de unidades domiciliares (IBGE, 2013).

A indústria brasileira de produtos e serviços para animais de estimação, cada vez mais em evidência, também ocupa posição de destaque, sendo segunda colocada no ranking de faturamento mundial, à frente do Reino Unido, França e Alemanha,

perdendo apenas para os Estados Unidos. Em 2014, esse mercado movimentou R\$ 16 bilhões com uma alta de 8,2% perante o ano anterior. Previsões da Abinpet estimam que em 2015 esse setor atinja R\$ 17,9 bilhões em faturamento, se tornando cada vez mais representativo para a economia brasileira. O mercado pet gera 1,02 milhão de empregos nas 521 indústrias, 287 laboratórios e instituições de ensino, além de 87.170 empresas que compõem a sua rede de comercialização (ABINPET, 2015).

1.3. Reprodução assistida

1.3.1. Cães x Espécies ameaçadas

A extinção é um processo lento e natural, mas deve manter-se em equilíbrio com o número de especiações. A exploração desenfreada do meio ambiente com consequente destruição de ecossistemas está entre as principais ameaças às espécies silvestres. O aumento populacional desordenado e a demanda por recursos naturais passíveis de ser utilizados têm desencadeado a perda e a fragmentação dos habitats de inúmeras espécies, promovendo assim o desaparecimento ou o isolamento de populações remanescentes. A destruição contínua de uma extensa área, dividindo-a em um ou mais fragmentos, desencadeia, dentre vários efeitos deletérios, a diminuição da biodiversidade, uma vez que a taxa de extinção se torna maior que a especiação (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Distantes, populações silvestres mantidas nessas condições tendem ao endocruzamento, estimulando assim a consanguinidade e a diminuição da variabilidade genética, aumentando a susceptibilidade às doenças e o comprometimento do seu potencial reprodutivo. A endogamia favorece o desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos, afetando a espermatogênese e a ovulação, o aumento de anormalidades espermáticas, a diminuição da fertilidade e a morbidade e mortalidade perinatal (O'BRIEN & MCCULLOGH, 1985; WILDT et al., 1987; BAMBERG, 1991; EIZIRIK et al., 2001).

Estratégias de conservação devem ser adotadas como medidas emergenciais para evitar o agravamento desse quadro crítico. A manutenção da fauna em seu habitat natural, denominada conservação *in situ*, é incontestavelmente a melhor estratégia para a preservação da biodiversidade, pois permite a perpetuação dos processos

evolucionários naturais. No intuito de se preservar comunidades bióticas em seus ecossistemas, surgem ações de relevante importância como a criação das Unidades de Conservação (UC), instituídas pela Lei 9.985, de 18 de julho de 2000 (COMIZZOLI et al., 2000; CATTO, 2006). No entanto, essas ações podem apresentar-se ineficientes na propagação de populações reduzidas, dificultando a manutenção de uma adequada variabilidade genética (PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

Em razão destas problemáticas, torna-se importante a adoção de estratégias de conservação *ex situ*, objetivando auxiliar a manutenção de populações geneticamente viáveis por meio de biotécnicas de reprodução assistida (ANDRABI & MAXWELL, 2007). Dentre as biotecnologias, cada vez mais aplicadas, estão a criopreservação de gametas, a inseminação artificial, a fertilização *in vitro* e a transferência de embriões (WILDT & ROTH, 1997; SWANSON, 1998). A criopreservação do sêmen tem-se apresentado como principal técnica voltada à conservação animal *ex situ*, por meio da criação de bancos de germoplasma de espécies ameaçadas (HIEMSTRA et al., 2005; ANDRABI & MAXWELL, 2007).

O avanço das biotecnologias de reprodução assistida tem despertado grande interesse da comunidade científica no que concerne à preservação de espécies carnívoras ameaçadas de extinção. Desde então, o desenvolvimento de biotecnologias utilizando animais domésticos filogeneticamente próximos, como modelo experimental, tem ganhado destaque. Neste cenário, o cão doméstico vem desempenhando importante papel, permitindo a pesquisa, o aprimoramento e a aplicabilidade dessas tecnologias às espécies silvestres ameaçadas (LUVONI, 2000; SILVA et al., 2003; PAULA, 2011). A perspectiva é de que estas técnicas possam ser aplicadas em programas de manejo e conservação de espécies silvestres como o lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*), a raposa-do-campo (*Pseudalopex sp.*), o cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) e o cachorro-do-mato-de-orelhas-curtas (*Atelocynus microtis*) (GOBELLO & CORRADA, 2003; LUVONI et al., 2006; MMA, 2014).

Nos últimos anos tem-se observado um crescente interesse do mercado cinófilo por biotécnicas reprodutivas que possibilitem maior aproveitamento do material genético de cães com características zootécnicas de interesse. O aperfeiçoamento dessas técnicas possibilita, principalmente, aumentar a variabilidade genética das raças caninas atuais, criadas e desenvolvidas sob intensa seleção endogâmica para fenótipos

desejáveis, como estético, temperamental ou habilidades específicas (LEPPANEN et al., 2000; URFER, 2009). A consequência prejudicial desse endocruzamento demonstra-se na alta incidência de doenças hereditárias. Mais de 400 doenças geneticamente herdadas são observadas em diversas raças (PATTERSON, 1993).

1.3.2. Criopreservação de sêmen

O intercâmbio entre os criadores profissionais de cães de todo o mundo tem despertado uma maior cobrança quanto ao aperfeiçoamento das biotecnologias reprodutivas para que haja maior incremento dos índices reprodutivos dos plantéis. Desta forma, destaca-se a criopreservação do sêmen, possibilitando o uso de animais de genética superior para fixação de características positivas. Além disto, a utilização do sêmen criopreservado possibilita a troca de material genético entre regiões distantes, evita os riscos de transmissão de diversas doenças e estresses associados ao transporte do animal. Outra grande vantagem, principalmente em respeito à conservação de espécies silvestres ameaçadas, é a possibilidade de armazenamento desse material por tempo indeterminado (ANDRABI & MAXWELL, 2007; SILVA, 2007).

A instalação de bancos de sêmen em instituições públicas e privadas, permitindo uma maior difusão de material genético, abre grandes perspectivas para os que trabalham com o melhoramento genético canino (FARSTAD, 1996; UCHOA et al., 2007). Contudo, os trabalhos desenvolvidos acerca da criopreservação de sêmen canino ainda são poucos e os protocolos utilizados foram desenvolvidos sem análise adequada dos danos funcionais causados à célula espermática (STROM HOLST, 1999; THOMASSEN et al., 2006).

O processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade. As bruscas mudanças de temperatura e a formação e dissolução de cristais de gelo, promovem injúrias às organelas celulares, baixando assim a qualidade do espermatozoide (WATSON, 1995). Esses danos podem ser evitados ou minimizados através da diluição da amostra em meio adequado para criopreservação. Estes meios são isotônicos (pH e osmolaridade compatíveis com o plasma seminal), de baixa toxicidade e favorecem, juntamente com crioprotetores, a proteção dos espermatozoides contra choques térmicos e osmóticos que ocorrem durante o processo de congelamento e

descongelamento (CASTELO et al., 2008). Vários diluentes têm sido empregados na congelamento de sêmen canino, com destaque para o diluente à base de Tris (tris-hidroximetil-aminometano) associado ao citrato, mais utilizado pelos grupos de pesquisa atuais e que tem apresentado resultado superior a outros diluentes. O Tris é um agente emulsificante usado para combater a acidose, é solúvel em água e se comporta como uma base fraca. Também é notória a sua capacidade de redução do índice de frutólise, contribuindo para a preservação da energia espermática (FARSTAD, 1996; SILVA et al., 2000).

A gema de ovo de galinha é o componente de origem biológica mais largamente utilizado na composição dos diluidores para o sêmen de cães, adicionada como agente crioprotetor ao tampão Tris (ENGLAND, 1993). No entanto, o mecanismo pelo qual a gema protege os espermatozoides ainda não foi totalmente elucidado. Estudos têm demonstrado que lipoproteínas de baixa densidade, como a fosfatidilcolina, componente da gema, seriam os responsáveis pela resistência ao choque térmico, à preservação da motilidade e a integridade tanto do DNA nuclear como das membranas espermáticas (MANJUNATH et al., 2002; MOUSSA et al., 2002). A incorporação de substâncias detergentes ao meio de congelamento, como o Equex STM Paste®, à base de SDS (dodecil sulfato de sódio), também tem melhorado a qualidade, a longevidade e a fertilidade dos espermatozoides pós-descongelamento. Este detergente atua tanto sobre a gema, solubilizando os fosfolípidos, quanto sobre a membrana espermática, aumentando sua permeabilidade, promovendo redução no estresse osmótico e resultando em aumento da integridade da membrana e da motilidade pós-descongelamento (HOLT, 2000; PEÑA et al., 2003; MAIA et al., 2008).

Outro importante crioprotetor, largamente empregado na congelamento de sêmen de cães, é o glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$). Um álcool polihídrico altamente permeável, o glicerol possui a capacidade de penetração através das membranas celulares, protegendo a célula da crioinjúria durante a fase de cristalização, que ocorre entre -6° e -10°C . A ausência deste, durante a criopreservação do sêmen canino, resulta em uma significativa redução na sobrevivência após a descongelamento (OLAR et al., 1989; SILVA et al., 2003; UCHOA, 2012).

Diversas metodologias têm sido descritas quanto à criopreservação do sêmen de cães. As mais usuais baseiam-se na metodologia descrita por Andersen (1975), que

tem servido como base para inúmeros trabalhos com algumas pequenas modificações, alcançando excelentes resultados. As variações vão de acordo com o diluente, os protetores de resfriamento e agentes crioprotetores empregados, assim como, diferentes velocidades de criopreservação (SILVA et al., 2001).

1.3.3. Metodologias para análise de sêmen

O principal objetivo das análises seminais é a determinação *in vitro* da capacidade fertilizante do sêmen e, conseqüentemente, da fertilidade de um reprodutor (GRAHAM, 2001). A manutenção desse potencial fertilizante depende da integridade e funcionalidade das diferentes estruturas da célula espermática, dificultando assim, o desenvolvimento de um teste laboratorial isolado que seja capaz de prevê-lo com exatidão. Desta forma, a realização de análises laboratoriais é de fundamental importância principalmente para amostras de sêmen submetidas à criopreservação (CELEGHINI, 2005; ANDRADE et al, 2007)

Até recentemente, os protocolos utilizados para análise do sêmen, nas diferentes espécies, baseavam-se em técnicas clássicas de microscopia óptica, sendo determinados os principais parâmetros da amostra, tais como: motilidade espermática, vigor, concentração espermática (milhões/dose), morfologia espermática, teste de termorresistência (TTR), teste hiposmótico (HOST) e colorações supravitais. Estas avaliações vêm sendo utilizadas desde a década de 1980 com base nas técnicas e padrões mínimos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para avaliação do sêmen *in natura* ou criopreservado (ARRUDA et al., 1992; RIJSSELAERE et al., 2003). Entretanto, diversos estudos apontam imprecisões nestas análises, mesmo quando executada por pesquisadores experientes. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes, da variabilidade entre os técnicos e da grande variação entre as metodologias usadas nas experimentações, tornando impraticável a comparação de dados (CELEGHINI, 2005; EILTS, 2005; ARRUDA et al., 2006).

Os ensaios de fertilização *in vitro* (FIV) representam as técnicas de maior sensibilidade na determinação do potencial fertilizante das amostras seminais, pois permitem a avaliação simultânea dos principais requisitos celulares exigidos para o

processo de fertilização. Contudo, o alto custo e o dispendioso tempo das avaliações, aliados à complexidade e à dependência da estabilidade laboratorial imposta pela FIV, dificultam a adoção destes métodos rotineiramente (HALLAP et al., 2004; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005). Desta forma, a combinação dos diversos métodos de avaliação seminal, comparando-os entre si, tanto quanto, a adoção de análises de parâmetros não comumente empregados nas avaliações de rotina, apresenta-se como melhor e mais acurada alternativa para predizer a qualidade de uma amostra seminal. A adoção desses procedimentos também permite quantificar a extensão dos danos celulares causados pela criopreservação, aperfeiçoando as técnicas de congelamento (CARDOSO et al., 2005; ARRUDA et al., 2011).

1.3.4. Uso de sondas fluorescentes

A descoberta de uma variedade de fluorocromos e compostos conjugados com sondas fluorescentes aumentaram a possibilidade de análise mais precisa e criteriosa da integridade estrutural dos espermatozóides, avaliando a qualidade bioquímica, estrutural e funcional do sêmen. Atualmente, uma grande variedade de sondas fluorescentes tem sido usada isoladamente ou em associação, pois a combinação destas possibilita a avaliação de diversos compartimentos espermáticos, simultaneamente. Por intermédio da microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo é possível avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal, juntamente com o potencial mitocondrial, dentre outros parâmetros (ARRUDA et al., 2003; CELEGHINI et al., 2007; GARDES et al., 2010).

Sondas fluorescentes que apresentam afinidade pelo DNA têm sido atualmente utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática das células espermáticas (SILVA & GADELLA, 2006). Dentre estas, destacam-se o iodeto de propídio (IP), as sondas Hoechst 33258 (H258) e Hoechst 33342 (H33342), a SYBR-14 e o diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) (CUNHA & LOPES, 2005; SOUZA et al., 2007).

O IP é incapaz de penetrar a membrana íntegra, contudo atravessa a membrana lesada e uma vez dentro da célula, liga-se ao material genético, emitindo fluorescência vermelha (MAXWELL et al., 1997; ARRUDA et al., 2003). Por ser um corante muito

estável, o IP tem-se evidenciado, apresentando êxito tanto nos resultados em microscopia de fluorescência quanto em sistema de citometria de fluxo. As sondas H258 e H33342 coram o núcleo de azul, contudo a H33342 é capaz de atravessar a membrana intacta, já o H258 somente a membrana lesada (CELEGHINI, 2005; GILLAN et al., 2005). O CFDA é um substrato incolor e hidrolisado rapidamente por esterases não específicas no interior da célula, produzindo o diacetato de carboxifluoresceína livre. Este corante é então retido dentro da célula com membrana plasmática intacta, exibindo fluorescência de coloração verde ou amarela (GARNER et al., 1997). O SYBR-14 cora o núcleo das células com a membrana plasmática íntegra em verde (AURICH, 2005).

A mensuração do potencial de membrana mitocondrial é realizada em virtude do importante papel biológico desempenhado pelas mitocôndrias, dispostas helicoidalmente na peça intermediária dos espermatozoides. O ATP produzido por estas estruturas serve como matriz energética para os movimentos flagelares (COSSON, 1996). Sendo assim, a integridade e a funcionalidade mitocondrial relacionam-se positivamente com a motilidade (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

As rodaminas e as carbocianinas são moléculas sensíveis ao potencial de membrana mitocondrial e não apresentam toxicidade ao espermatozoide (REERS et al., 1991). Estas sondas são transportadas para o interior da célula pela respiração mitocondrial, portanto, quanto mais funcional mais corante será acumulado. Mais comumente utilizadas, a Rodamina 123 (R123) e o MitoTracker red ou Chloromethyl-X-rosamine (CMXRos) são capazes de corar mitocôndrias em células vivas, promovendo imagens de alta fluorescência em verde para a R123 e vermelha para CMXRos (BENEL et al., 1986). Entretanto, células vivas coradas com CMXRos exibiram muito mais fluorescência fotoestável do que as coradas com R123 (POOT et al., 1996). Ambas as sondas apresentam algumas limitações, uma delas é corar todas as células com função mitocondrial, não possuindo assim, capacidade de diferenciar membranas de alto ou baixo potencial (GRAHAM & MOCE, 2005). Para superar esta limitação pode ser utilizada a sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), um múltímero de carbocianina que permite distinguir diferentes potenciais de membrana por meio de códigos de cor. A

fluorescência emitida altera do verde para o laranja ou vermelho de acordo com o aumento do potencial de membrana (REERS et al., 1991).

Visto que, a incapacidade fertilizante dos espermatozoides pode ser proveniente de diversos fatores, a avaliação simultânea dos diferentes compartimentos da célula espermática permite prognóstico mais acurado sobre a integridade desta célula como um todo (GRAHAM, 2001). Neste contexto, as associações de sondas fluorescentes têm sido realizadas com precisão para a análise da membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial (ANDRADE et al., 2007; ARRUDA et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007; CELEGHINI et al., 2010; CSERMAK JR, 2011).

1.3.5. Testes de ligação

A habilidade do espermatozoide em ligar-se à zona pelúcida do ovócito, evento crítico no processo de fecundação, envolve o reconhecimento de receptores presentes na zona pelúcida por proteínas de ligação correspondentes, presentes na superfície do espermatozoide (MAYENCO-AGUIRRE & PÉREZ-CORTÉS, 1998; SINOWATZ et al., 2003; RATH et al., 2005). Desta forma, testes de interação entre os gametas, predizendo a capacidade de ligação do espermatozoide ao ovócito, tem-se apresentado como métodos valiosos na avaliação de técnicas de criopreservação de sêmen, pois estão diretamente relacionados à capacidade fecundante dos espermatozoides (BARBATO et al., 1998; CSERMAK JR, 2011). Dentre estes testes, citam-se a fertilização in vitro (FIV) (PELAEZ et al., 2006) e testes de ligação/penetração à zona pelúcida (PIV) utilizando ovócitos homólogos (da mesma espécie doadora do sêmen) (MACEDO et al., 2006) ou heterólogos (espécies distintas) (LASSERRE et al., 2000; CAMPOS, 2015).

Os testes de penetração possuem como vantagem, em relação à FIV, uma menor demanda de tempo, visto que não há necessidade da maturação do ovócito, e apenas a ligação/penetração é avaliada, não o desenvolvimento embrionário (HEWITT & ENGLAND, 1997). Estes testes permitem avaliar várias características e funções do espermatozoide, simultaneamente, como a sua habilidade em sofrer reação acrossomal, ligar-se à zona pelúcida e penetração na membrana do ovócito (LIU & BAKER, 2002). Também são capazes de identificar danos espermáticos moleculares, o que não é

possível por meio de análise convencional (STROM-HOLST et al., 2001). Entretanto, a grande vantagem destes testes é a capacidade de avaliação do que seria o ponto crucial mais próximo do teste final: a fecundação in vivo (CSERMAK JR, 2011).

A partir de ensaios realizados com humanos nos anos 80, o teste de ligação entre gametas homólogos vem se mostrando eficiente na distinção entre indivíduos pertencentes a grupos férteis, inférteis e sub-férteis (LIU & BAKER, 1993; OEHNINGER et al., 1997; BASTIAAN et al., 2002). Novas experimentações têm comprovado eficiência do ensaio também para outras espécies, como o cão. Assim, ensaios in vitro de ligação entre espermatozoides e ovócitos homólogos tornaram-se obrigatórios para avaliar a capacidade fertilizante do espermatozoide frente aos danos causados pelo processo de congelamento/descongelamento (STRÖM HOLST et al., 2000).

Segundo Sinowatz et al. (2003), a utilização de ovócitos provenientes de animais domésticos filogeneticamente próximos é possível com a remoção da zona pelúcida, pois elimina a especificidade de espécies para espermatozoides. Ensaios in vitro de ligação entre espermatozoides e ovócitos heterólogos apresenta-se como importante alternativa quando aplicados a programas de reprodução assistida de animais silvestres ameaçados de extinção. Atualmente, alguns destes ensaios permitiram ligações com resultados satisfatórios em estudos realizados com onça pintada (*Panthera onca*) (PAZ, 2000), gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) (BAUDI et al., 2008), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (ARAÚJO, 2012), cateto (*Pecari tajacu*) (CAMPOS, 2015), dentre outros.

Apesar da grande confiabilidade depositada nos testes de ligação, fatores limitantes como a necessidade de obtenção do número adequado de ovócitos, bem como seu custo elevado, inviabilizam a sua utilização como avaliação de rotina (COETZEE et al., 1998). Outro entrave se deve quanto à variação individual de qualidade entre os ovócitos e suas doadoras, podendo gerar vieses na interpretação dos resultados (EILTS, 2005; SANTOS, 2009), justificando assim, o desenvolvimento de outros métodos de avaliação in vitro. Pesquisadores têm buscado então, substratos alternativos para a ligação do espermatozoide, objetivando maior padronização das variáveis envolvidas.

Wishart et al. (1997) observando ovos de galinhas, perceberam que muitos espermatozoides que não haviam fecundado o ovócito continuavam presos à membrana

perivitelina após a passagem do ovo pelo oviduto. A partir dessa observação, um novo teste in vitro foi desenvolvido por Barbato et al. (1998) utilizando ejaculados de galos, com diferentes graus de fertilidade, sobre um substrato da membrana perivitelina isolada. Esses pesquisadores obtiveram correlações positivas simulando a interação entre gametas, onde a membrana desempenhou ação homóloga à zona pelúcida de ovócitos (BARBATO et al., 1998). Outros pesquisadores avaliaram a mesma técnica em mamíferos, obtendo também resultados promissores (AMORIM, 2008; SANTOS, 2009; CSERMAK JR, 2011; ARAÚJO, 2012; GARAY, 2012).

A principal vantagem do uso da membrana perivitelina, em relação aos ovócitos, é que este método permite o teste de diferentes amostras de sêmen sobre um mesmo substrato, ou seja, diferentes fragmentos de uma mesma membrana, minimizando assim a variação embutida ao teste pelo ‘efeito fêmea’. Ademais, a membrana perivitelina é de fácil obtenção e manipulação, tornando o método mais simples e menos dispendioso em relação ao uso de ovócitos de mamíferos silvestres e domésticos (CSERMAK JR, 2011). No mercado já está disponível um substrato sintético feito a partir da membrana. Estas apresentações comerciais foram usadas em suínos e mostraram-se capazes de responder diferentemente, frente a ejaculados de diferentes capacidades fertilizantes (REIS et al., 2003).

Neste cenário, o teste de ligação utilizando a membrana perivitelina de galinhas surge como uma promissora ferramenta na avaliação espermática de mamíferos domésticos e silvestres, predizendo e validando o potencial fertilizante de amostras tanto de sêmen fresco quanto congelado.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Foram utilizados quatro cães adultos, sem raça definida, provenientes do Canil Experimental do Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Animais Silvestres (REPAAS) do Setor de Morfofisiologia Animal do Departamento de Veterinária - UFV. Os animais foram mantidos, durante todo o procedimento experimental, em baias individuais, sob condições normais de manejo alimentar com ração comercial

disponível uma vez ao dia e livre acesso à água. Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA: 86/2014).

2.2. Colheita, processamento e avaliação do sêmen

As colheitas de sêmen foram realizadas no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Animais Silvestres (REPAAS). A fração do ejaculado, rica em espermatozoides, foi coletada por manipulação peniana em tubo para centrifugação tipo Falcon pré-aquecido a 38 °C. Adotou-se um intervalo de dois dias entre as colheitas dos ejaculados, totalizando um mínimo de três colheitas por animal.

O sêmen puro (sem diluição) foi homogeneizado com o auxílio de micropipeta, sendo retirada uma alíquota para análise de vigor e motilidade espermática. Em seguida, 1 mL do ejaculado foi pré-diluído na proporção de 1:1 (v/v) com meio de manutenção (MM). Desta pré-diluição foram retiradas 3 alíquotas: a primeira para avaliação da concentração espermática, a segunda para a realização do teste hiposmótico (HOST) e a terceira para realização da incubação a 38 °C com as sondas fluorescentes. A concentração espermática foi determinada por meio de câmara de Neubauer e o sêmen foi padronizado para concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL em meio de manutenção.

Os procedimentos de avaliação espermática foram realizados conforme descrito a seguir:

- Vigor e motilidade espermática: foram avaliados a partir de uma alíquota de 10 µL do sêmen pré-diluído entre lâmina e lamínula aquecidas a 38 °C e observado em microscópio de luz (Olimpus® 400x). Os valores do vigor espermático (intensidade de movimento) foram estabelecidos entre 0 e 5, e a motilidade espermática retilínea progressiva entre 0 e 100 %, conforme as normas padronizadas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

- Morfologia: Uma alíquota de sêmen foi adicionada em fixador Karnovsky até turvar a mistura. Posteriormente foram feitas lâminas pelo método de câmara úmida e avaliadas 200 células com o uso de microscópio de contraste de fase (Nikon®), quanto a presença

de defeitos espermáticos. Os defeitos espermáticos foram subdivididos em maiores e menores (CBRA, 2013).

- Teste hiposmótico (HOST): em uma alíquota de 20 µL do sêmen diluído em meio de manutenção (MM) foram adicionados 250 µL de solução hiposmótica de sacarose a 150 mOsmol/Kg (CSERMAK JR, 2011). Após 30 minutos de incubação a 38 °C foi adicionado 0,5 mL do fixador Karnovsky modificado (gluteraldeído 2,5 %, formaldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2 e CaCl₂ 0,001 M). Foram contadas 200 células e aquelas que apresentaram cauda dobrada, fortemente dobrada, cauda enrolada e fortemente enrolada foram consideradas reativas ao teste. Foram subtraídas deste resultado as patologias semelhantes encontradas na análise morfológica. A contagem foi realizada em microscópio de contraste de fase (Nikon® 1000x) em preparação úmida.

2.3. Criopreservação do sêmen

Para a criopreservação, uma amostra do sêmen pré-diluído foi novamente diluída, na proporção 1:1 v/v, em meio de congelamento (MC) à base de TRIS citrato com glicerol a 12 % e Equex STM Paste® a 1 % (Tab. 1) resultando em uma concentração final de 6 % de glicerol, 0,5 % de Equex STM Paste e 50 x 10⁶ espermatozoides móveis/mL. O sêmen foi então resfriado e congelado segundo metodologia descrita por Mascarenhas (2008). Desta forma, foi envasado em palhetas de 0,25 mL, resfriadas em uma taxa de 0,56 °C/min por uma hora até a temperatura de 4 °C. Para tal, as palhetas foram acondicionadas em um tubo de ensaio fechado no interior de um recipiente de vidro contendo 800 mL de água a 38 °C, acondicionado em uma caixa isotérmica fechada (24 x 19,5 x 28,5 cm) e envolto por 6,67 L de gelo e água (1:1). Após esta etapa, o sêmen foi mantido a 4 °C por mais uma hora como tempo de equilíbrio. Posteriormente, as palhetas foram transferidas para uma plataforma flutuante, em uma caixa isotérmica, 10 cm acima do nitrogênio líquido para serem congeladas. Após 15 minutos, as palhetas foram submersas no nitrogênio líquido e raqueadas em botijão de criopreservação. Para o descongelamento, as palhetas foram imersas em água a 38 °C por, no mínimo, 30 segundos e o sêmen descongelado foi submetido às mesmas análises citadas para o sêmen fresco.

2.4. Sondas fluorescentes

Para a avaliação da membrana plasmática e o potencial de membrana mitocondrial foi utilizada a associação das sondas: iodeto de propídio (IP), Hoechst 33342 (H342) e MitoTracker red (CMXRos).

Em 5 μL do sêmen diluído à fresco foram adicionados 30 μL de H33342 e incubados por 10 minutos. Decorrido este tempo, 2 μL de IP foi adicionado, homogeneizado e incubado por mais 2 minutos para posterior leitura (CELEGHINI, 2005; CSERMAK JR., 2011). Para o sêmen descongelado foram utilizadas as mesmas sondas IP e H33342, assim como o mesmo protocolo descrito, adicionando-se apenas 0,3 μL de CMXRos ao IP (CELEGHINI, 2005). As leituras foram realizadas depositando uma gota do sêmen incubado entre lâmina e lamínula pré-aquecida a 38 °C e avaliada em microscópio de epifluorescência (Motic), equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm) (400x e 1000x). Foram contabilizadas 100 células por análise.

2.5. Ensaio de ligação entre os espermatozoides e a membrana perivitelina

Os ovos utilizados na experimentação foram obtidos de postura realizada no mesmo dia da experimentação, e não embrionados. A preparação da membrana perivitelina do ovo de galinha (MPOG) teve início na separação entre a clara e a gema do ovo. Após este procedimento, a gema intacta foi acondicionada em placa de Petri contendo solução fisiológica estéril de NaCl a 0,9 %. Com o auxílio de tesoura oftálmica foi realizada uma pequena secção na membrana perivitelina e, por este orifício, a gema foi succionada utilizando-se seringa de 10 mL. Posteriormente, injetou-se, cuidadosamente, solução fisiológica estéril de NaCl a 0,9 % para uma completa lavagem até remoção de mais resquícios visuais de gema ou clara. Em seguida a MPV foi transferida para outra placa de Petri, também contendo solução fisiológica estéril de NaCl a 0,9 %. Nesta última placa foram realizados os cortes dos fragmentos de membrana destinados ao ensaio de ligação. Estes procedimentos foram realizados com auxílio de um microscópio estereoscópico (Zeiss).

A membrana foi acondicionada sobre um halo de silicone vazado de vão circular interno com diâmetro de 4 mm, e externo de 8 mm, encaixado perfeitamente em um segundo halo de 8 mm de diâmetro, ficando a membrana fixada e com uma área exposta, a ser avaliada, de 12,56 mm² (Fig. 1) (CSERMAK JR, 2011).



Figura 1: Halo de silicone utilizado para fixação da membrana perivitelina

Posteriormente, três suportes contendo os fragmentos de membrana foram transferidos para uma placa de cultivo. Cada fragmento foi acondicionado em uma escavação contendo 500 µL de meio TCM-199 modificado (COSTA, 1994). O fragmento foi incubado em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂, 95 % de umidade relativa e 38 °C, permanecendo por 30 minutos para estabilização. Após este período, cada escavação recebeu 20 µL de sêmen com concentração de 0,5 x 10⁶ espermatozoides/mL, procedimento este, adotado tanto para o sêmen a fresco como para o descongelado. Após os 30 minutos de incubação, foram adicionados 100 µL da sonda fluorescente Hoechst 33342, e o material foi homogeneizado por meio de movimentos circulares. Aos 50 minutos de incubação foram adicionados 20 µL de iodeto de propídio e novamente foi feita a homogeneização (CSERMAK JR, 2011). Estes procedimentos foram realizados em ambiente escuro e sobre placa aquecedora a 38 °C. Após 60 minutos de incubação, os fragmentos foram lavados quatro vezes em meio Talp-Hepes modificado (COSTA, 1994). Em seguida foi efetuada a montagem das lâminas, onde cada fragmento, ainda no suporte, foi colocado entre lâmina e lamínula de vidro. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência (Nikon) equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm) (400x). Foram avaliadas três amostras

de MPOG por animal, onde todas as células espermáticas ligadas à membrana foram contadas.

2.6. Análises estatísticas

A avaliação dos dados baseou-se nas médias, desvios-padrão e coeficientes de variação, e para a comparação das médias foi calculado o intervalo de confiança com margem de 5 % de erro, empregando a função estatística do programa Windows Excel, 2010. Verificou-se a correlação entre as variáveis com o uso da Correlação Simples de Pearson.

3. Resultados e Discussão

O processo de criopreservação provoca danos aos espermatozoides, diminuindo seus parâmetros qualitativos e, conseqüentemente, sua capacidade de fertilização (THOMASSEN, 2006). Neste estudo, demonstraram-se os danos por meio da redução nos valores obtidos ($p < 0,05$) nos testes de rotina (vigor espermático, motilidade espermática e células reativas ao teste hiposmótico) entre o sêmen a fresco e descongelado.

Tabelas 1: Média, desvios-padrão e coeficiente de variação dos parâmetros seminais avaliados em sêmen fresco e criopreservado de cães.

Animal	Sêmen Fresco		Sêmen Descongelado	
	$\bar{X} \pm s$	CV	$\bar{X} \pm s$	CV
Vigor (0-5)				
1	4,30 ± 0,41 ^a	9,7	2,78 ± 0,52 ^a	18,84
2	4,43 ± 0,39 ^a	8,79	2,28 ± 0,59 ^a	25,77
3	4,70 ± 0,24 ^a	5,21	2,60 ± 0,58 ^a	22,42
4	4,60 ± 0,22 ^a	4,86	2,60 ± 0,41 ^a	16,08
Motilidade (%)				
1	89,00 ± 0,02 ^a	2,98	38,00 ± 0,13 ^a	34,48
2	88,00 ± 0,03 ^a	4,04	25,00 ± 0,07 ^a	28,28
3	93,00 ± 0,02 ^a	2,63	29,00 ± 0,06 ^a	22,42
4	95,00 ± 0,00 ^a	-	34,20 ± 20,32 ^a	59,43
HOST (%)				
1	82,57 ± 3,20 ^a	3,87	30,14 ± 5,93 ^a	19,67
2	70,00 ± 17,77 ^a	25,38	19,57 ± 11,64 ^a	59,48
3	88,60 ± 3,00 ^a	3,39	27,00 ± 8,51 ^a	31,51
4	80,37 ± 8,18 ^a	10,18	50,5 ± 14,22 ^a	28,16
H33342(%)				
1	43,00 ± 15,36 ^a	35,72	24,43 ± 10,65 ^a	43,59
2	60,71 ± 7,43 ^a	12,25	21,28 ± 6,36 ^{ab}	29,89
3	47,40 ± 6,83 ^a	14,4	17,40 ± 9,87 ^{abc}	56,73
4	68,00 ± 7,06 ^a	10,38	10,00 ± 9,72 ^{bc}	97,21
IP (%)				
1	57,00 ± 15,36 ^a	26,95	75,57 ± 10,65 ^a	14,09
2	39,28 ± 7,43 ^a	18,93	78,71 ± 6,36 ^a	8,08
3	52,60 ± 6,83 ^a	12,98	83,20 ± 9,84 ^a	11,83
4	26,50 ± 6,73 ^a	25,42	37,75 ± 24,47 ^a	64,81

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p<0,05); CV: Coeficiente de Variação / HOST: teste hiposmótico / H342: Hoechst 33342 (células com membrana plasmática íntegra) / IP: Iodeto de Propídio (células com membrana plasmática lesada).

Na avaliação do sêmen fresco dos quatro animais, os parâmetros seminais para vigor (ideal ≥ 3) e motilidade espermática (ideal $> 70\%$) apresentaram-se dentro dos padrões recomendados no Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do CBRA (2013) para fins de congelamento. Entretanto, o mesmo não ocorreu para as amostras pós-descongelamento, havendo diminuição ($p < 0,05$) para valores abaixo dos padrões recomendados. Os valores médios para vigor espermático apresentaram-se abaixo do preconizado pelo CBRA (ideal ≥ 3) nos quatro animais. A motilidade apresentou médias satisfatórias (ideal $\geq 30\%$) apenas para os animais 1 e 4 (Tab. 1). Nas amostras do sêmen descongelado, vigor e motilidade espermática correlacionaram-se positivamente ($p < 0,05$) nos quatro animais. Contudo, no sêmen a fresco, apenas o animal 1 apresentou correlação positiva ($r = 0,80$; $p < 0,05$) entre estes parâmetros.

Valores de vigor e motilidade espermática representam bons indicadores da integridade e funcionalidade celular, uma vez que a movimentação representa uma manifestação dos componentes estruturais dos espermatozoides, altamente correlacionada com a taxa de fertilidade, normalidade morfológica e integridade da membrana espermática, fatores indispensáveis à fecundação (HAFEZ & HAFEZ, 2004; PEÑA-MARTINEZ, 2004; THOMASSEN et al., 2006).

O processo de congelamento/descongelamento é o maior responsável pelo mecanismo de desestabilização da bicamada fosfolipídica, importante componente da membrana citoplasmática dos espermatozoides (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Por meio do teste hiposmótico é possível avaliar a funcionalidade desta membrana, ao expor o sêmen a um meio hiposmótico, onde os espermatozoides que apresentarem membrana citoplasmática intacta e funcional, responderão ao teste pelo ganho de água, resultando em enrolamento e dobramento de sua cauda (ENGLAND & PLUMMER, 1993). Neste estudo foi possível observar diminuição ($p < 0,05$) do número de células reativas ao meio hiposmótico das amostras do sêmen a fresco para o sêmen descongelado. Outros autores, mesmo utilizando composições de meios hiposmóticos diferentes, também obtiveram resultados significativos para a mesma análise (SILVA, 2005; MASCARENHAS, 2008; CSERMAK JR, 2011).

O emprego das sondas fluorescentes na andrologia busca avaliar integridade e função de compartimentos específicos da célula espermática (CELEGHINI et al., 2007).

A realização de testes envolvendo as associações de sondas fluorescentes é importante para o incremento das técnicas de avaliação seminal, aumentando os resultados condizentes ao status de cada estrutura, além de apresentarem alta repetibilidade. Ainda é imprescindível identificar as sondas que melhor se associam, pois determinadas sondas quando associadas a outras, podem apresentar resultados variados, alterando suas características e seus padrões de fluorescência (CELEGHINI, 2005).

Os espermatozoides avaliados com as três sondas (H33342, IP e CMXRos) apresentaram fluorescência nítida (Fig. 2). As células com integridade de membrana plasmática foram observadas em azul, devido à coloração com o H33342 demonstrando eficiência no papel de contra corante do IP, responsável pela coloração vermelha das células com membrana plasmática lesada. A sonda CMXRos ao ligar-se às mitocôndrias, destacadamente marcou a peça intermediária de células com potencial mitocondrial em vermelho, conforme o esperado.

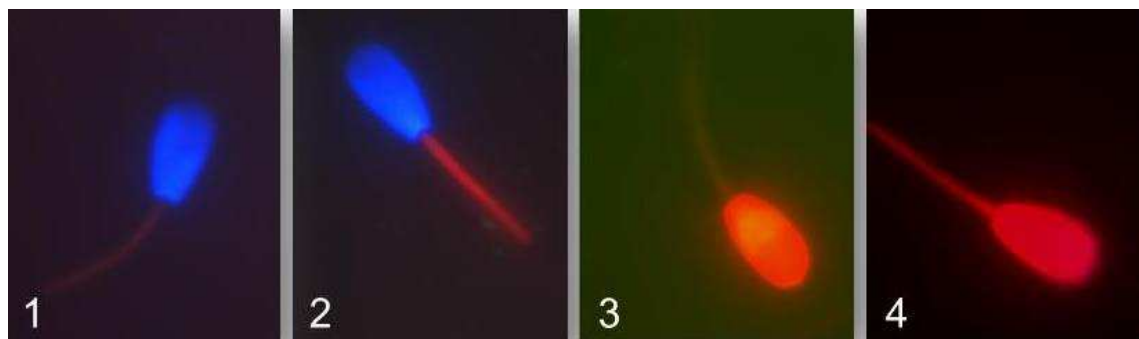


Figura 2: Espermatozóides caninos corados pela associação das sondas fluorescentes H33342, IP e CMXRos.

1: espermatozoide corado pela sonda H33342 / 2: espermatozoide corado com as sondas H33342 e CMXRos / 3: espermatozoide corado pela sonda IP / 4: espermatozoide corado pelas sondas IP e CMXRos.

No presente estudo foi possível observar que a média do número de células com integridade da membrana plasmática (coradas com H33342) foi significativamente superior no sêmen fresco ($59,69 \pm 14,19$) do que no sêmen descongelado ($19,43 \pm 10,46$), enquanto que as células com membrana plasmática comprometida (coradas com IP) para o sêmen fresco ($45,34 \pm 15,24$) aumentou significativamente para o sêmen descongelado ($71,60 \pm 20,51$), nos quatro animais avaliados. Esses valores se apresentam

de acordo com o esperado, por consequência do tratamento de criopreservação a que o sêmen foi submetido.

Não foi observada correlação entre os parâmetros vigor e motilidade espermática com as sondas H33342 e IP para avaliação da integridade da membrana plasmática, no sêmen fresco. Para o sêmen descongelado, apenas o animal 1 apresentou correlação negativa da motilidade espermática com a sonda IP ($r = - 0,7$; $p < 0,05$) e correlação positiva da motilidade espermática com a sonda H33342 ($r = 0,70$; $p < 0,05$).

A aferição da integridade de membrana plasmática por meio do teste HOST, no sêmen fresco, não apresentou correlação com as populações coradas como íntegras pelas sondas fluorescentes. Contudo, apresentou alta correlação positiva ($p < 0,05$) para o sêmen descongelado de 3 animais, demonstrando que o teste hiposmótico utilizado foi sensível ao aumento de danos de membrana plasmática causados pelo protocolo de congelamento/descongelamento, dado também observado por outros autores (SILVA, 2005; ROTA et al., 2006; MASCARENHAS, 2008; CSERMAK JR, 2011). Foram observadas altas correlações positivas ($p < 0,05$), para os animais 1, 2 e 4. Desta forma, o teste hiposmótico apresenta real valor preditivo na detecção da integridade funcional da membrana plasmática no sêmen descongelado.

Para integridade da membrana plasmática nos animais 1, 2 e 4, determinada pela sonda H33342 e o HOST, foi observado comportamento linear (Fig. 3), nas quais foram registrados altos coeficientes de determinação ($R^2 = 0,71$; $R^2 = 0,83$; $R^2 = 0,77$), indicando, mais uma vez, a alta correlação entre os parâmetros.

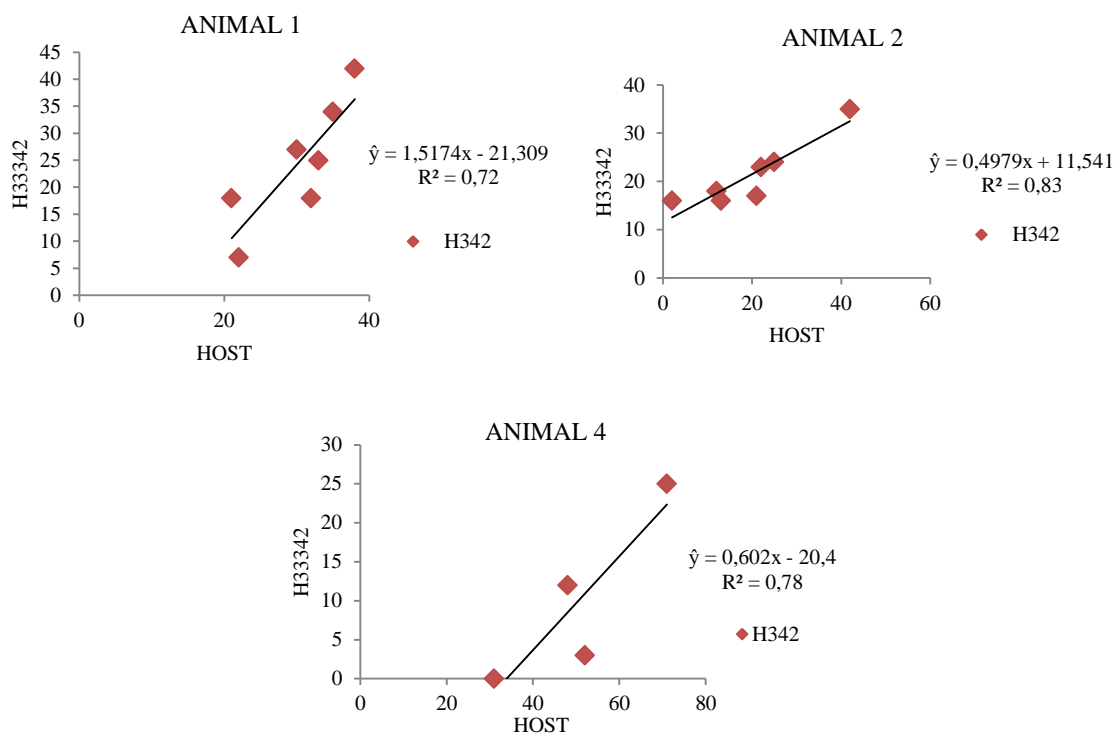


Figura 3: Dispersão demonstrando correlação positiva ($p < 0,05$) entre as variáveis: sonda fluorescente H33342 e o teste hiposmótico (HOST) para o sêmen descongelado.

A fecundação envolve um processo complexo e para ser capaz de penetrar o ovócito e ativar o desenvolvimento embrionário, a célula espermática precisa, primeiramente, alcançar o local de fertilização (BRAUNDMEIER; MILLER, 2001). Desta forma, a higidez das membranas espermáticas é de extrema importância para que todo esse processo ocorra, almejando-se assim, técnicas mais objetivas para sua avaliação.

A avaliação simultânea da integridade da membrana plasmática e da função mitocondrial aumenta a acurácia da análise do sêmen, pois fornece maior número de dados para a determinação da porcentagem de células espermáticas na amostra, com capacidade para fertilizar o ovócito. Neste trabalho, a associação das sondas H33342 e IP com a sonda CMXRos no sêmen descongelado mostrou-se eficaz para a distinção de quatro diferentes populações celulares nos ejaculados analisados, detectando de forma precisa o efeito deletério da criopreservação (Tab. 2). A sonda CMXRos quando ligada às mitocôndrias com potencial de membrana, emitiu fluorescência vermelha, tornando

possível, principalmente, o esboço das células com membrana plasmática íntegra, coradas em azul.

Tabela 2: Populações de espermatozoides de cães isoladas pela associação das sondas H33342, IP e CMXRos.

Populações	H33342	IP	CMXRos
Membrana plasmática íntegra, com potencial de membrana mitocondrial (IC)	+	-	+
Membrana plasmática íntegra, sem potencial de membrana mitocondrial (IS)	+	-	-
Membrana plasmática lesada, com potencial de membrana mitocondrial (LC)	-	+	+
Membrana plasmática lesada, sem potencial de membrana mitocondrial (LS)	-	+	-

H342: Hoechst 33342 / IP: Iodeto de Propídio / CMXRos: MitoTracker red.

Neste estudo, não houve diferenças significativas em termos de função mitocondrial entre os animais (Tab. 3).

Tabela 3: Médias \pm desvios-padrão seguidos do coeficiente de variação das populações de espermatozoides isoladas pela associação das sondas H33342, IP e CMXRos para o sêmen descongelado.

Animal	IC	IS	LC	LS
1	23,85 \pm 10,90 ^a (45,72)	0,57 \pm 1,04 ^a (183,71)	74,43 \pm 10,29 ^a (45,72)	1,14 \pm 1,55 ^a (135,78)
2	18,14 \pm 6,75 ^a (37,20)	3,14 \pm 3,22 ^b (102,65)	67,14 \pm 5,43 ^a (8,09)	11,57 \pm 4,92 ^b (42,55)
3	16,40 \pm 9,15 ^a (55,83)	0,40 \pm 0,80 ^a (200,00)	80,80 \pm 12,00 ^a (14,89)	2,40 \pm 3,00 ^c (125,27)

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$); IC: membrana plasmática íntegra, com potencial de membrana mitocondrial. IS: membrana plasmática íntegra, sem potencial de membrana mitocondrial. LC: membrana plasmática lesada, com potencial de membrana mitocondrial. LS: membrana plasmática lesada, sem potencial de membrana mitocondrial.

A média das populações celulares que apresentaram potencial de membrana mitocondrial (IC = 16,40 a 23,85) (LC = 67,14 a 80,80) foi superior às médias das populações celulares que não apresentaram potencial de membrana mitocondrial (IS = 0,40 a 3,22) (LS = 1,14 a 4,92). Também foi observado que mais de 60 % dos espermatozoides analisados, pertenciam à população LC, ou seja, apresentavam membrana plasmática lesada, porém com potencial de membrana mitocondrial. Em estudo realizado por Valcárcel et al. (1994) analisando simultaneamente a integridade da membrana plasmática e a motilidade espermática, revelou a existência de grande população de espermatozoides com dano de membrana plasmática, mas apresentando-se móveis imediatamente após a descongelação. Este resultado sugere que, após o descongelamento, a integridade de membrana é drasticamente reduzida, enquanto o efeito na motilidade espermática não é tão evidente. Sendo assim, a preservação da membrana plasmática, mais frágil do que a membrana mitocondrial, é o ponto mais crítico para o sucesso da criopreservação (VALCÁRCEL et al., 1994).

No animal 1 foi possível observar alta correlação positiva ($r = 0,82$; $p < 0,05$) da população IC com a motilidade pós-descongelamento, indicando que a CMXRoS reflete o status do potencial de membrana mitocondrial (Fig. 2). Sabe-se que a disfunção mitocondrial com consequente parada de produção de ATP, pode ser um fator responsável pela diminuição da motilidade espermática, geralmente observada após o descongelamento (MEDEIROS et al., 2002). Resultados semelhantes foram observados por HALLAP et al. (2005) utilizando a sonda Mitotracker Deep Red em sêmen bovino descongelado.

A população com membrana plasmática íntegra e com potencial de membrana mitocondrial (IC) é a categoria mais representativa da viabilidade espermática já que possui, teoricamente, as duas estruturas celulares acessadas com integridade estrutural e/ou funcional.

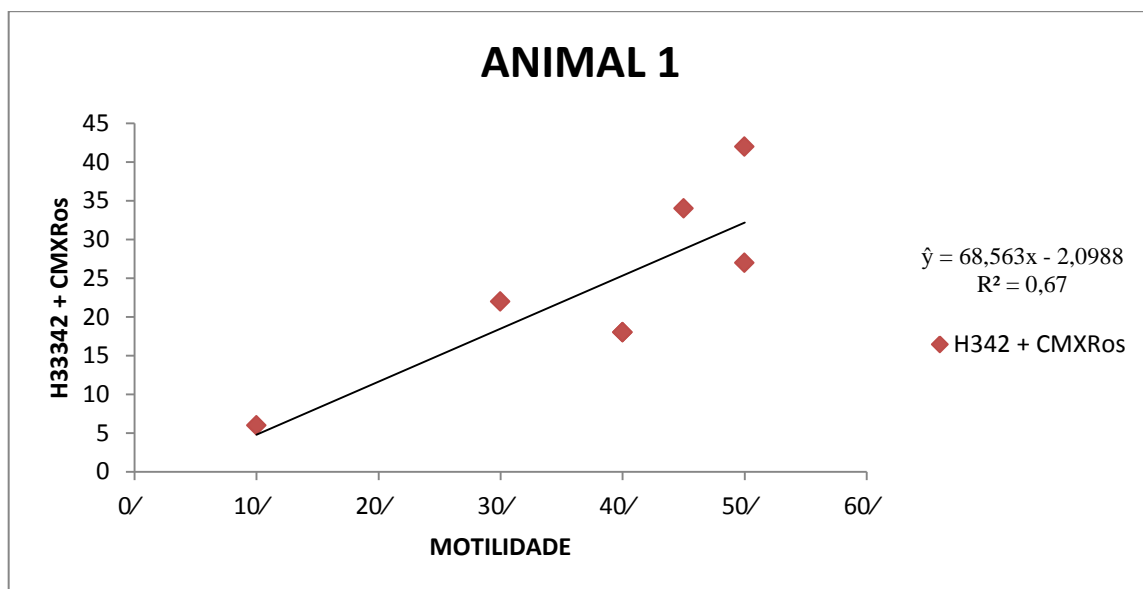


Figura 4: Dispersão demonstrando correlação positiva ($p < 0,05$) da população IC (H33342 + CMXROs) com a motilidade espermática para o sêmen descongelado de cães.

Nas análises de correlação da sonda CMXROs com o teste hiposmótico (HOST) pós-descongelamento foram observados resultados semelhantes à última correlação citada. Houve correlação moderada ($r = 0,60$; $p < 0,5$) e alta ($r = 0,80$; $p < 0,5$) para os animais 3 e 4, respectivamente. Desta forma, o teste hiposmótico apresentou maior sensibilidade ($R^2 = 0,68$) à detecção de células com potencial de membrana mitocondrial quando comparada a avaliação da motilidade espermática ($R^2 = 0,67$) (Fig. 3). Apesar de representarem técnicas amplamente utilizadas na rotina de avaliação seminal, o teste hiposmótico e a motilidade espermática apresentaram sensibilidade semelhante à sonda CMXROs.

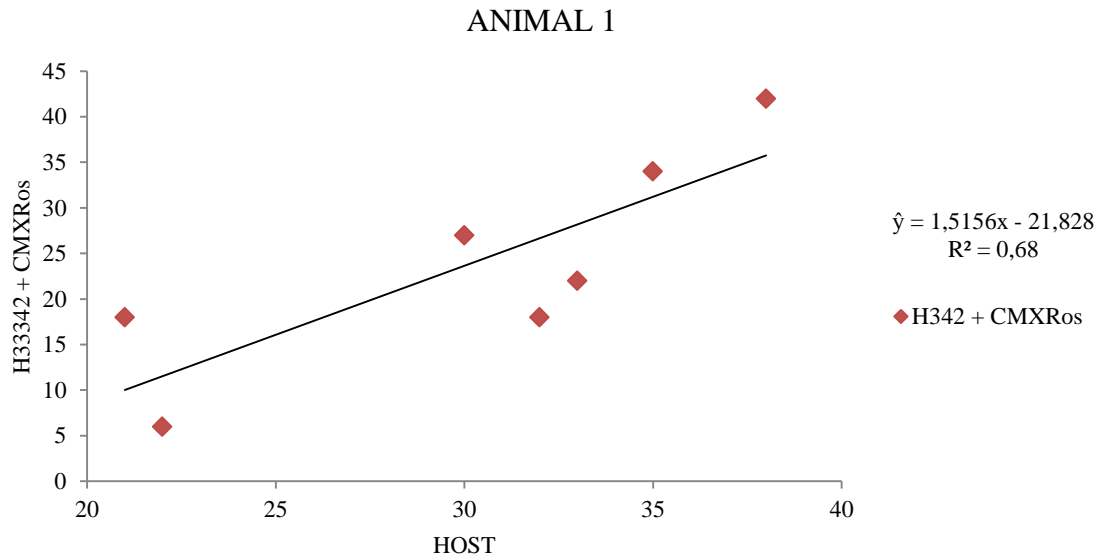


Figura 5: Dispersão demonstrando correlação positiva ($p < 0,05$) da população IC (H33342 + CMXROs) com o teste hiposmótico (HOST) para o sêmen descongelado de cães.

A fertilização, processo de fusão entre os gametas masculino e feminino, tem início no prévio reconhecimento das proteínas de ligação da superfície do espermatozoide pelos receptores da zona pelúcida do ovócito (SINOWATZ et al., 2003; HAFEZ & HAFEZ, 2004; RATH et al., 2005). Desta forma, testes de ligação entre espermatozoides e ovócitos homólogos ou heterólogos são de grande importância para avaliação da qualidade seminal, revelando danos muitas vezes imperceptíveis aos testes rotineiros de microscopia (STRÖM HOLST et al., 2000; CARDOSO et al., 2005).

A principal glicoproteína encontrada na superfície da zona pelúcida, implicada na ligação espermática é a proteína ZP3 (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Esta proteína mantém grande homologia entre espécies distintas e mesmo entre classes zoológicas. Em bancos de dados de associações de pesquisa, como por exemplo, o GenBank, é possível a obtenção, via on line, do perfil de aminoácidos de proteínas sequenciadas, além da sua comparação interespecífica. Desta forma, observou-se a homologia de aproximadamente 59 % entre a ZP3 do cão doméstico e da galinha, demonstrando, portanto, a possível interação e consequente ligação à membrana perivitelina da gema do ovo de galinhas (MPOG) com espermatozoides de espécies distintas (CSERMAK JR., 2011).

No presente estudo foi utilizada a associação das sondas iodeto de propídio e Hoechst 33342 para identificação, por meio de microscopia de fluorescência, das células espermáticas ligadas à MPOG. Observou-se que espermatozoides de cão foram capazes de se ligar à MPOG tanto no sêmen fresco quanto no sêmen descongelado. Entretanto, o sêmen descongelado apresentou redução ($p < 0,05$) no total de espermatozoides ligados à MPOG quando comparado ao sêmen a fresco (Tab. 4). Para três, dos quatro animais avaliados, houve redução de mais de 60 % do total de espermatozoides descongelados ligados à MPOG.

Tabela 4: Médias \pm desvios-padrão seguidos do coeficiente de variação dos resultados observados no total de células ligadas à membrana perivitelina do ovo de galinha (MPV) nas amostras de sêmen canino fresco e descongelado.

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
Total Fresco	232,00 \pm 62,94 ^a (27,13)	158,00 \pm 25,00 ^a (15,81)	212,33 \pm 26,53 ^a (12,49)	166,00 \pm 64,94 ^a (39,12)
Total Descongelado	77,00 \pm 12,83 ^b (16,66)	90,00 \pm 5,35 ^b (5,95)	83,66 \pm 9,87 ^b (11,80)	58,66 \pm 20,00 ^b (34,10)

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Barbato et al. (1998) em trabalho com sêmen de galo também observaram redução semelhante, entre o sêmen a fresco e descongelado, e atribuíram a esta queda, os danos celulares causados pelo processo de congelamento do sêmen.

Não foram observadas correlações entre número total de espermatozoides ligados à MPOG com os índices de vigor e motilidade espermáticos para o sêmen fresco e descongelado de nenhum dos animais avaliados. Para os animais 1 e 4, foram observadas correlações positivas entre o total de espermatozoides frescos ligados à MPOG com as células reativas ao HOST, para o mesmo tratamento (Fig. 4).

Desta forma, na tentativa de se estabelecer correlações entre os testes rotineiros de avaliação seminal com o número de células ligadas a MPOG, o teste hiposmótico

apresentou-se como o único parâmetro de previsibilidade da capacidade de ligação do sêmen canino. Estes resultados reforçam que este teste apresenta-se como com bom indicador da fertilidade seminal (SOUZA, 2003).

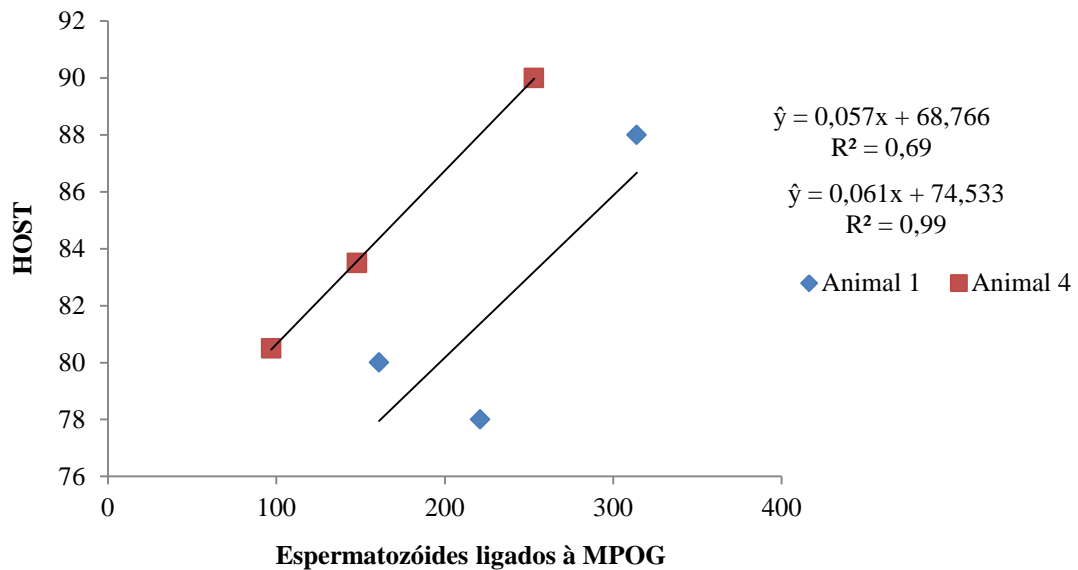


Figura 6: Dispersão demonstrando correlação positiva ($p < 0,05$) entre o teste hiposmótico (HOST) com o total de células ligadas à membrana perivitelina da gema de ovo (MPOG) para o sêmen a fresco de cães.

A membrana plasmática é a parte da estrutura do espermatozoide mais susceptível a modificações durante o processo de criopreservação (VALCÁRCEL et al., 1994). De acordo com os resultados obtidos, é possível determinar que o processo de criopreservação causou lesões incapacitantes na estrutura da membrana plasmática inviabilizando as células espermáticas de se ligarem à membrana perivitelina da gema do ovo de galinha.

4. Conclusões

A associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio, Hoechst 33342 e MitoTracker red permite a distinção de quatro populações celulares a partir da integridade da membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial em ejaculados de cães domésticos.

A associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio e Hoechst 33342 possibilita a quantificação e qualificação dos danos causados à membrana plasmática pelo processo de congelamento/descongelamento.

A sonda MitoTracker red correlaciona-se positivamente com a motilidade espermática e o teste hiposmótico, na avaliação da funcionalidade da membrana mitocondrial dos espermatozoides criopreservados. Sugere-se, desta forma, sua inclusão nos protocolos de análise seminal como teste complementar, pois aumenta a acurácia em prever a qualidade seminal.

O teste hiposmótico apresenta-se como bom indicador da integridade da membrana plasmática.

A membrana perivitelina da gema do ovo de galinha demonstrou ser um substrato sensível à ligação de espermatozoides de qualidades distintas, podendo nestas condições ser utilizada como valioso teste de avaliação de protocolos de criopreservação do sêmen canino.

5. Referências Bibliográficas

AMORIM, E. A. M. Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen. 2008. 174 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

ANDERSEN, K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchtygiene*, v. 10, p.1-4, 1975.

ANDRABI, S. M. H. & MAXWELL, W. M. C. A Review of Reproductive Biotechnologies for Conservation of Endangered Species. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p. 223 – 243, 2007.

ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potencial and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, p. 190-194, 2007.

ARAÚJO, G. R. 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. 64 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

ARRUDA, R. P.; BARNABE, V. H.; ALENCAR, M. M.; BARNABE, R. C. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termorresistência: efeitos sobre a fertilidade. *Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 29, p. 131-137, 1992.

ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões

pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, p. 226-227, 2003. Suplemento.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; PERES, K. R.; NEVES, L. C. Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. *Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, Londrina, 2, 157-164, 2006.

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 31, p. 8-16, 2007.

ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J.D.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 35, p. 45-51, 2011.

ABINPET - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site/faq/>>. FAQ. Acesso em: 02 de set. 2015.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stores stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 89, p. 65-75, 2005.

BAMBERG, E.; MOSTL, E.; PATZL, M. KING, G. J. Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 22, p. 73-77, 1991.

BARBATO, G. F.; CRAMER, P. G.; HAMMERSTEDT, R. H. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 686-699, 1998.

BASTIAAN, H.S; MENKVELD, R.; OEHNINGER, S.; FRANKEN D.R. Zona pellucida induced acrosome reaction, sperm morphology, and sperm-zona pellucida binding assessments among subfertile men. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 19, p. 329-334, 2002.

BAUDI, D. L.; JEWGENOW, K.; PUKAZHENTHI, B. S.; SPERCOSKI, K. M.; SANTOS, A. S.; REGHELIN, A. L.; CANDIDO, M. V.; JAVOROUSKI, M. L.; MÜLLER, G.; MORAIS, R. N. Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*, v. 69, p. 204-211, 2008.

BRAUNDMEIER, A. G.; MILLER, D. J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1915-1925, 2001.

BENEL, L.; RONOT, X.; KORPROBST, M.; ADOLPHE, M.; MOUNOLOU, J. C. Mitochondrial uptake of rhodamine 123 by rabbit articular chondrocytes. *Cytometry*, v. 7, p. 281-285, 1986.

CAMPOS, L. B. Interações in vitro entre espermatozoides de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) e substratos heterólogos. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 29, p. 179-187, 2005.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 2, p. 67-75, 2008.

CATTO, A. L. Sistema nacional de unidades de conservação: questões essenciais. 2006. 115 f. Dissertação (Mestrado em Direito) – Faculdade de Direito, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2006.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.

CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ALBUQUERQUE, R.; SILVA, F. H. A.; FARIA DE ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes in fowl spermatozoa. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 9, p. 143-149, 2007.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, p. 536-543, 2010.

COETZEE, K.; KRUGE, T. F.; LOMBARD, C. J.; Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Human Reproduction Update*, v. 4, p. 73-82, 1998.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive Biotechnology for Endangered Mammalian Species. *Reproduction Nutrition Development*, v. 40, p. 493-504, 2000.

COPPINGER, L.; COPPINGER, R. *Dogs: A New Understanding of Canine Origin, Behavior and Evolution*. Chicago: University of Chicago Press, 2002. 356p.

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biology International*, 20, 83-94, 1996.

COSTA, E. P. Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos bovinos in vitro. 1994. 155 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

CSERMAK Jr., A. C. 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 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. D. Efeito de três diferentes diluidores sobre o sêmen canino submetido a dois protocolos de descongelamento. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 42, p. 372-380, 2005.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J. *Tratado de Anatomia Veterinária*. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2004. 813p.

EILTS, B. E. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, v. 64, p. 685-691, 2005

EIZIRIK, E.; KIM, J.H.; RAYMOND, M.M.; GRAWSHAW JR, P.G.; O'BRIEN, S.J.; JOHNSON, W.E. Phylogeography, Population History and Conservation Genetics of Jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, v. 10, p. 65 – 79, 2001.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 47, p. 243 -255, 1993.

ENGLAND, G.C.W.; PLUMMER J.M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*, v. 47, p. 261-270, 1993.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 251–260, 1996.

GARAY, R. M. Uso de sondas fluorescente 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 gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*). 2012. 71 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

GARDES, T. P.; CARDOSO, R. N. R.; ARRUDA, R. P.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; GALLEGOS, A. M.; ANDRADE, A. F. C. Comparação da eficiência de meios para a capacitação dos espermatozoides através das análises por citometria de fluxo e computadorizada da motilidade. In: Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação do Departamento de Reprodução Animal, 3, 2010, Pirassununga. Anais... São Paulo: USP/FMVZ, 2010.

GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 1401-1406, 1997.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v. 63, p. 445-457, 2005.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, v. 68, p. 239-247, 2001.

GRAHAM, J.K & MOCE, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v. 64, p. 492-504, 2005.

GRANDJEAN, D. & VAISSAIRE, J. J. Enciclopédia do cão Royal Canin. Paris: Editora Aniwa, 2001. 635p.

GOBELLO, C. & CORRADA, Y. Biotechnology in canine reproduction: an update. *Acta Veterinaria*, v. 23, p. 30-37, 2003.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. Barueri: MANOLE, 2004, 513p.

HALLAP, T.; HAARD, M.; JAAKMA, U.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? *Theriogenology*, v. 62, p. 702-713, 2004.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; Rodriguez- Martinez, H. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red. *Theriogenology*, p. 63, v. 2311-2322, 2005.

HEWITT, D. A. & ENGLAND, G. C. W. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoa performance in vitro. *Animal Reproduction Science*, v. 50, p. 123-139, 1997.

HIEMSTRA, S. J.; VAN DER LENDE, T.; WOELDERS, H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. *The Role of Biotechnology*, p. 5-7, 2005.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v. 53, p. 47-58, 2000.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pns/2013/>>. Acesso em: 15 de set. 2015.

IUCN – The World Conservation Union. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs - Status Survey and Conservation Action Plan. Canid Specialist Group. 2004.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: W.B.Saunders, 2001. 592p.

LASSERRE, A.; CEBRAL, E.; VITULLO, A. D. Successful capacitation and homologous fertilization in vitro in *Calomys musculinus* and *Calomys laucha* (Rodentia – Sigmodontinae). *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 120, p. 41-47, 2000.

LEONARD, J. A.; WAYNE, R. K.; WHEELER, J.; VALADEZ, R.; GUILLÉN, S.; VILÀ, C. Ancient DNA Evidence for Old World Origin of New World Dogs. *Science*, v. 298, p. 1613, 2002.

LEPPANEN, M; MAKI, K. SALONIEMI, H. Estimation of heritability of hip dysplasia in German Shepherd Dogs in Finland. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 117, p. 97-103, 2000.

LIU, D. Y. & BAKER, H. W. G. Inhibition of acrosin activity with a Trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biology of Reproduction*, v. 48, p. 340-48, 1993.

LIU, D. Y.; BARKER, H. W. G. Evaluation and assessment of sêmen for IVF/ICI. *Asian Journal of Andrology*, v. 4, p. 281-285, 2002.

LOBÃO, A. O. A origem do cão e domesticação. Artigos e coletânea. *Jornal de Piracicaba*, São Paulo, p. 16. 1992.

LUVONI, C. G. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reproduction Nutrition Development*, v. 40, p. 505-512, 2000.

LUVONI, G. C.; CHIGIONI, S.; BECCAGLIA, M. Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 14, p. 286-290, 2006.

MACEDO, M.C. JR.; DESCHAMPS, J. C.; LUCIA JR, T.; BORDIGNON, J.; SERRET, C. G.; RAMBO, G.; PIVATO, I.; SCHMITT, E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. *Animal Reproduction Science*, v. 92, p. 334-348, 2006.

MAIA, M. S.; AZEVEDO, H. C.; BICUDO, S. D.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Efeito da adição do equex-STM ao diluente tris-gema na motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p. 311, 2008.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the lowdensity lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

MASCARENHAS, R. M.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; LANNA, L. L.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D. Morfometria macro e microscópica e índices

somáticos dos componentes testiculares de cães sem raça definida, da puberdade à senilidade. *Revista Ceres*, v. 53, p. 106-112, 2006.

MASCARENHAS, R.M. Avaliação individual e racial da qualidade do sêmen canino in natura e criopreservado em diferentes protocolos. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MAYENCO-AGUIRRE, A. M. & PÉREZ CORTÉS, A. B. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 50, p. 195-204, 1998.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction of Fertility and Development*, v. 8, p. 1165-1178, 1997.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v. 57, p. 327-344, 2002.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Brasileira ameaçadas de extinção. Portaria nº 444 de 17 de dezembro de 2014. Brasília. Diário Oficial da União: 245: 121–126.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

O'BRIEN, M.K., D.R. MCCULLOGH. Survival of Black-Tailed Deer Following Relocation in California. *Journal of Wildlife Management*, v. 49, p. 115 – 119, 1985.

OEHNINGER, S.; FRANKEN, D.; KRUGER, T. Approaching the next millennium: how should we manage andrology diagnosis in the intracytoplasmic sperm injection era? *Fertility and Sterility*, v. 67, p. 434-436, 1997.

OLAR, T.T.; BOWEN, R.A.; PICKETT, B.W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, v. 31, p. 451-461, 1989.

PATTERSON, D. F. Understanding and controlling inherited diseases in dog and cat. *Tidjschr Diergeneeskd*, v. 118, p. 23-27, 1993.

PAULA, T. A. R. Reprodução de carnívoros silvestres. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35, 103-132, 2011.

PAZ, R.C.R.; ZUGE, R.M.; BARNABE, V.H.; MORATO, R.G.; FELIPPE, P.A.N.; BARNABE, R.C. Avaliação da capacidade de penetração de sêmen congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em oócitos heterólogos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 37, p. 6, 2000.

PELAEZ, J.; et al. In vitro evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0.25 ml straws. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, p. 153-161, 2006.

PEÑA, A.I.; LUZ, L.L.; BARRIO, M.; HERRADÓN, P.G.; QUINTQLA, L.A. Effect of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v. 59, p. 1725-39, 2003.

PEÑA-MARTINEZ, A. I. Canine Fresh and Cryopreserved Semen Evaluation. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 209-224, 2004.

POOT, M; ZHANG, Y. Z.; KRAMER, J. A.; WELLS, K. S.; JONES, L. J.; HANZEL, D. K.; LUGADE, A. G.; SINGER, V. L.; HAUGLAND, R. P. Analysis of

mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 44, p. 1363-1372, 1996.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. *Biologia da conservação*. Londrina: Planta, 2001. 327p.

RATH, D.; TÖPFER-PETERSEN, E.; MICHELMANN, H. W.; 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*, v. 63, p. 352-362, 2005.

REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, v. 30, p. 4480-4486, 1991.

REIS, G.R., BERNARDI, M.L., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F.P., WEITZE, K.F., AMANN, R., KELLERS, C., ZEMMRICH, J. Fertilidade de sêmen suíno avaliada pelo teste de ligação dos espermatozóides a um substrato sintético. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 38, p. 1343-1349, 2003.

RIJSSELAERE, T.; SOOM, A. V.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, v. 60, p. 1553- 1568, 2003.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, 2005, Goiânia - GO. *Anais... Palestra...* Belo: Horizonte - MG: CBRA, 2005. 8p.

ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G.; MARTINI, M. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, v. 65, p. 1848-1858, 2006.

SANTOS, M. C. R. Avaliação de métodos alternativos para análises da capacidade de ligação do espermatozoide caprino e estudo do polimorfismo no gene Izumo em caprino, devido à ação do congelamento do sêmen. 2009. 54 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SAVOLAINEN, P; ZHANG, Y-P.; J.; LUNDEBERG, J.; LEITNER, T. Genetic evidence for an East Asian of domestic dogs. *Science*, v. 298, p. 1610-1613, 2002.

SCHELLING, C.; GAILLARD, C.; DOLF, G. Genetic variability of seven dog breeds based on microsatellite markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 122, p. 71-77, 2005.

SERPEL, J. A. 1995. *The Domestic Dog: Its Evolution, Behavior and Interactions with People*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 10-46 p.

SILVA, A. R. Criopreservação do sêmen canino diluído em tris: avaliação morfológica, 428 funcional e de suas interações com ovócitos homólogos. 2005. 146 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. *Ciência Rural*, v. 6, p. 1021-1025, 2000.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Efeito das etapas do processamento de criopreservação sobre a qualidade do sêmen canino diluído em Tris. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 25, p. 474, 2001.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 98, p. 53-60, 2003.

SILVA, A.R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 31, p. 119-127, 2007.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v. 65, p. 958-978, 2006.

SINOWATZ, F.; WESSA, E.; NEUMÜLLER, C.; PALMA, G. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reproduction of Domestic Animals*, v. 38, p. 141-146, 2003.

SOUZA, F. F. Caracterização eletroforética do perfil proteico e análise bioquímica do plasma seminal canino. 2003. 98 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2003.

SOUZA, F. F.; BARRETO, C. S.; LOPES, M. D. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. *Theriogenology*, v. 68, p. 100-106, 2007.

STRÖM HOLST, B. In vitro characterization of cryopreserved canine spermatozoa. 1999. 104 p. Tese (Doutorado) – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

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. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 119, p. 201–206, 2000.

STRÖM HOLST, B.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LAGERSTEDT, A. S.; LINDEFORSBERG, C. Prediction of the

oocyte recovery rate in the bitch. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 48, p. 587-592, 2001.

SWANSON, F. W. Curso de Extensão – felinos selvagens, Biotécnicas reprodutivas e conservação. Setor de Ciências Biológicas. Curitiba - PR: UFPR, 5 – 10 p, 1998.

THOMASSEN, R.; SANSON, G.; KROGENAES, A.; FOUIGNER, J. A.; ANDERSEN BERG, K.; FARSTAD, W. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology*, v. 66, p. 1645-1650, 2006.

UCHOA, D.C.; SATZINGER, S.; AMARAL, M.C.; SILVA, L.D.M. O uso de diferentes diluidores para inseminação artificial com sêmen canino refrigerado. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2007, Curitiba - PR. Anais... Curitiba: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2007. 182 p.

UCHOA, D.C.; SILVA, T.F.P.; CARDOSO, J.F.S.; MOTA FILHO, A.C.; JUCÁ, R.P.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). *Theriogenology*, v. 77, p. 1959-1963, 2012.

URFER, S. R. Inbreeding and fertility in Irish Wolfhounds in Sweden: 1976 to 2007. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.51, p. 21, 2009.

VALCÁRCEL, A.; De las HERAS, M. A.; PERÉZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent Staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*, v. 41, p. 483-489, 1994.

VILÀ, C.; SAVOLAINEN, P.; MALDONADO, J. E.; AMORIM, I. R.; RICE, J. E.; HONEYCUTT, R. L.; CRANDALL, K. A.; LUNDEBERG, J.; WAYNE, R. K. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, v. 276, p. 1687-1689, 1997.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, v. 7, p. 871-891, 1995.

WAYNE, R. K. & VILA, C. Phylogeny and origin of the domestic dog. In: *The genetics of the dog*, Eds. A. Ruvinsky, J., Sampson, CAB International. 2001. 1- 13p.

WILDT, D. E.; BUSH, M.; GOODROWE, K. L.; PACKER, C.; PUSEY, A. E.; BROWN, J. L.; JOSLIN, P.; O'BRIEN, S. J. Reproductive and Genetic Consequences of Fouding Isolated Lion Populations. *Nature*, v. 329, p. 328 – 331, 1987

WILSSON, E.; SUNDGREN, P. The use of a behaviour test for the selection of dogs for service and breeding: Method of testing and evaluating test results in the adult dog, demands on different kinds of service dogs, sex and breed differences. *Animal Behaviour Science*, v. 53, p. 279-295, 1997.

WILDT, D. E.; ROTH, T. R. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. *London: International Zoo Yearbook*, 1997.164-172 p.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. Johns Hopkins University Press, v. 3, p. 2-142, 2005.

WISHART, G. J. 1997. Quantitative aspects of sperm: egg interaction in chickens and turkeys. *Animal Reproduction Science*, v. 48, p. 81-92, 1997.

ANEXOS

ANEXO I

Composição dos meios utilizados

TRIS-CITRATO

Meio de manutenção (MM) e de congelamento (MC) usados.

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

TCM-199

Modificado por COSTA (1994)

Componente	Quantidade
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 (não qsp)	14 mL

Talp-Hepes

BAVISTER et al., (1983), modificado por COSTA, 1995

Componentes	mM	Quantidade
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

ANEXO II

Diluições dos Fluoróforos para Preparo das Soluções Estoque e de Trabalho das Sondas Fluorescentes

Conforme CELEGHINI, 2005.

Iodeto de Propídio

Solução estoque

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

Solução Trabalho (0,5 mg/mL)

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

Solução trabalho (2 mg/mL)

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

Armazenar em freezer, no escuro.

Hoescht 33342

Solução estoque

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

Solução trabalho

1,6 μ L da solução estoque (25 mg/mL) + 998,4 μ L de DPBS (40 μ g/mL)

Armazenar a -20°C no escuro

CMXRos (MitoTracker Red)

Solução trabalho (DMSO) – 500 μ M