

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Efeito da adição de serina no diluente de resfriamento nos parâmetros de
cinética espermática de caninos**

Maria Eduarda Bicca Dode

Pelotas, 2018

Maria Eduarda Bicca Dode

**Efeito da adição de serina no diluente de resfriamento nos parâmetros de
cinética espermática de caninos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Antonio Sérgio Varela Junior

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D643e Dode, Maria Eduarda Bicca

Efeito da adição de serina no diluente de resfriamento nos parâmetros de cinética espermática de caninos / Maria Eduarda Bicca Dode ; Antonio Sérgio Varela Jr., orientador. — Pelotas, 2018.

36 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Aminoácido. 2. Canis familiaris. 3. Espermatozoide. 4. Resfriamento. I. Jr., Antonio Sérgio Varela, orient. II. Título.

CDD : 636.7

Maria Eduarda Bicca Dode

Efeito da adição de serina no diluente de resfriamento nos parâmetros de cinética espermática de caninos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/02/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior (Orientador)
Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande

Prof^a. Dr^a. Carine Dahl Corcini
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Eliza Rossi Komninou
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Vinícius Campos Farias
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico esse trabalho a Deus, aos meus pais, Luciana e Joaquim Dode por terem me dado o apoio e suporte necessário.

Agradecimentos

Aos meus pais, Luciana e Joaquim, por sempre me incentivarem a seguir os meus sonhos. Pelos ensinamentos e pelo exemplo diário de como ser uma pessoa correta. Amo vocês! A minha família, principalmente minha irmã, por sempre me estimular com tua garra e determinação.

Aos meus fieis amigos Sentinela Farrapo pelo companheirismo e pelas grandes participações nesse trabalho, sem eles não seria possível literalmente.

Ao meu orientador professor Antonio Sérgio, pelo aprendizado e experiências adquiridas nestes dois anos de convívio. Com certeza levarei na bagagem a base teórica e as práticas. A professora Carine, por ter sido fundamental para que os trabalhos com reprodução de pequenos ganhasse espaço e reconhecimento dentro da nossa universidade.

Aos meus queridos colegas de trabalho no ReproPel, em principalmente à minha estagiária que esteve comigo durante toda elaboração e execução do trabalho, e também às colegas de pós-graduação com quem dividi inúmeras angústias e felicidades, em especial às que me auxiliaram durante a execução do trabalho. Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e participaram deste processo, e com quem compartilhei estes últimos anos. Obrigada!

Resumo

DODE, Maria Eduarda Bicca. **Efeito da adição de serina no diluente de resfriamento nos parâmetros de cinética espermática de caninos.** 2018. 36f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Crescentes demandas zootécnicas e de conservação de espécies ameaçadas tem geraram a necessidade de aprimoramento de biotécnicas reprodutivas em caninos. A conservação de sêmen através da refrigeração promove alterações celulares capazes de interferir na viabilidade dos espermatozoides. Sendo assim, a adição de um diluente adequado deve ser capaz de proteger e conservar os espermatozoides. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de serina no meio diluidor sobre a cinética espermática do sêmen canino resfriado. Foram realizadas 12 coletas, utilizando 4 cães da raça Australian Cattle Dog sendo ejaculados com motilidade superior a 60% e vigor ≥ 3 . Foram testados diluentes Tris gema 20% (TG) com adição nove concentrações diferentes de serina (S) de 2,5mM a 200mM de S. Um grupo sem aminoácido foi utilizado como controle (TG0). Foram analisados no "Computerized-assisted sperm motility analysis" dos parâmetros de cinética nas horas zero, 24, 48 e 72 de resfriamento a 4° C. Na hora zero, os seguintes resultados para motilidade total (MT) e progressiva (MP) respectivamente foram: no controle (63,3 e 57,6%) e no tratamento 2,5mM S (59,2 e 52,3%), 5mM S (61,1 e 55,1%), 10mM S (57,7 e 50,1%) e 20mM S (57,9 e 50,5%). Após 24 horas os parâmetros DAP, DCL, DSL, VAP, VCL e VSL nos tratamentos controle (30,6, 50,7 e 25,7 μm , 67,1, 111,11 e 56,4 $\mu\text{m/s}$) e 2,5mM S (28,9, 49,2 e 24,2 μm , 64,4, 109,1 e 53,7 $\mu\text{m/s}$) foram superiores e nas 48 horas a MT, MP e DAP do 5mM S (47,8 e 39,7%, 22,1 μm), demonstrou resultados superiores aos demais tratamentos. Na avaliação final, 72 horas, a MT no tratamento 2,5mM S (27,7%) foi superior, já a MP não diferiu nos tratamentos 2,5mM S (18,3%) e controle (17,2%) sendo esses superiores aos demais. Todos os tratamentos acima de 20mM S apresentaram resultados inferiores aos descritos. A adição de serina em concentrações de até 5 mM são promissoras para uso em diluentes de sêmen canino visando manter os parâmetros de motilidade espermática, sendo o potencial protetor da adição de serina em diluidores de sêmen canino é dose e tempo dependente.

Palavras-chave: aminoácido; *Canis familiaris*; espermatozoide; resfriamento

Abstract

DODE, Maria Eduarda Bicca. **Effect of serine addition on the cooling diluent on canine sperm kinetic parameters.** 2018. 36f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Growing zootechnical and conservation demands of endangered species of canids generate the desire to improve reproductive biotechnology in canines. The conservation of semen through refrigeration promotes cellular alterations capable of interfering in the viability of spermatozoa. Thus, the addition of a suitable extender which is capable of protecting and preserving spermatozoa is essential. The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of serine in the extender medium on the sperm kinetics of cold canine semen. Twelve collections were performed, using 4 Australian Cattle Dog dogs being ejaculated with motility higher than 60% and vigor ≥ 3 . 20% Tris yolk diluents (TG) were added with addition of nine different concentrations of serine (S) from 2.5mM to 200mM S. A group without amino acid was used as control. They were analyzed in the computerized-assisted sperm motility analysis the kinetic parameters at zero hours, 24, 48 and 72 cooling at 4° C. At time zero, the following results for total (MT) and progressive motility (MP) were: in the control (63.3 and 57.6%) and in the treatment 2.5mM S (59.2 and 52.3%), 5mM S (61.1 and 55.1%), 10mM S (57, 7 and 50.1%) and 20mM S (57.9 and 50.5%). After 24 hours the parameters DAP, DCL, DSL, VAP, VCL and VSL in the control treatments (30.6, 50.7 and 25.7 μm , 67.1, 111.11 and 56.4 $\mu\text{m} / \text{s}$) and 2.5mM S (28.9, 49.2 and 24.2 μm , 64.4, 109.1 and 53.7 $\mu\text{m} / \text{s}$) were higher and in the 48 hours the MT, MP and DAP of 5mM S (47.8 e 39.7%, 22.1 μm), showed superior results to the other treatments. In the final evaluation, 72 hours, the MT in the treatment 2.5mM S (27.7%) was superior, whereas the MP did not differ in treatments 2.5mM S (18.3%) and control (17.2%) those superior to the others. All treatments above 20 mM S presented lower results than those described. The addition of serine at concentrations up to 5 mM is promising for use in canine semen extender in order to maintain sperm motility parameters, the protective potential of the addition of serine in canine semen diluents being dose and time dependent.

Keywords: aminoadic; *Canis familiaris*; sperm; cooling

Lista de Figuras

- Figura 1 Efeito de diferentes concentrações de Serina (2,5 mM, 5 mM e 10 mM) e o controle (0), em amostras de sêmen canino, resfriados a 4°C por 72 horas sobre os parâmetros de motilidade espermática progressiva (p) e total (t) analisados no CASA (computer Assisted Sperm Analysis)..... 31

Lista de Tabelas

Tabela 1	Efeito da adição diferentes concentrações de serina (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50 mM, 100 mM,200 mM) no diluente TG em amostras resfriadas de sêmen canino sobre parâmetros de motilidade espermática analisado pelo CASA na hora zero (Computer Assisted Sperm Analysis).....	27
Tabela 2	Efeito da adição diferentes concentrações de serina (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50 mM, 100 mM,200 mM) no diluente TG em amostras resfriadas de sêmen canino sobre parâmetros de motilidade espermática analisado pelo CASA nas 24 horas (Computer Assisted Sperm Analysis).....	28
Tabela 3	Efeito da adição diferentes concentrações de serina (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50 mM, 100 mM,200 mM) no diluente TG em amostras resfriadas de sêmen canino sobre parâmetros de motilidade espermática analisado pelo CASA nas 48 horas (Computer Assisted Sperm Analysis).....	29
Tabela 4	Efeito da adição diferentes concentrações de serina (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50 mM, 100 mM,200 mM) no diluente TG em amostras resfriadas de sêmen canino sobre parâmetros de motilidade espermática analisado pelo CASA nas 72 horas (Computer Assisted Sperm Analysis).....	30

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALH	Deslocamento lateral de cabeça
BCF	Frequência de batimento cruzado
CASA	Computerized-assisted sperm motility analysis
DAP	Distância média percorrida
DCL	Distância curvilínea
DSL	Distância retilínea
IA	Inseminação artificial
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S	Serina
TG	Tris-gema
VAP	Velocidade média de percurso
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade curvilínea
WOB	Oscilação

Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
©	Copyright
°C	Grau Celsius
µm/s	Micrómetro por segundo
%	Porcentagem
mM	Milimolar

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Revisão da Literatura.....	14
3 Artigo.....	19
4 Considerações Finais.....	32
Referências.....	33

1 Introdução

A cinofilia vem avançando e exigindo da medicina veterinária o suporte científico e tecnológico capaz de suprir a crescente demanda de criadores e proprietários pelas biotécnicas reprodutivas. Aprimoramento de metodologias aplicáveis a caninos são o reflexo da relevância econômica e social dos cães na sociedade contemporânea, pois além do valor zootécnico e de aptidões e habilidades específicas, os cães podem ser utilizados como modelo experimental para outras espécies inclusive algumas ameaçadas de extinção (PENA et al., 2006).

A inseminação artificial (IA) é uma técnica mais amplamente difundida, seguida da preservação de sêmen de curto prazo através de técnicas de resfriamento e de longo prazo através do congelamento de temperaturas ultrabaixas.

A inseminação artificial pode ser utilizada para atender a diferentes necessidades e objetivos através do controle do manejo reprodutivo aplicado aos machos, fêmeas ou ambos podendo ser realizada imediatamente após a coleta com o sêmen fresco, com sêmen conservado a curto prazo, através do resfriamento ou com sêmen conservado a temperaturas ultrabaixas e depois descongelado (OLLERO et al., 1998; HOTTINSHEAD, 2017). Os procedimentos podem ser simples com a inseminação artificial intra vaginal ou cirúrgicos através de laparotomia ou laparoscopia.

As técnicas variam com os objetivos porém, visam garantir a fecundação e concepção sem que haja interferência da variabilidade de tamanho, dificuldades de cópula, falta de libido e limitações de origem sanitária (FELDMAN & NELSON, 2004; OLLERO et al., 1998) contudo a capacidade de preservação e conservação da viabilidade espermática é essencial. Para manter a elevada viabilidade e fertilidade do sêmen canino a curto prazo é necessário além de técnicas adequadas de manejo, coleta e resfriamento a utilização de um diluente capaz de suprir as demandas metabólicas dos espermatozoides de forma estável, prevenindo alterações celulares, genéticas e o estresse oxidativo.

A adição de aminoácidos livres aos meio de diluição pode contribuir para reduzir os danos das espécies reativas de oxigênio produzidas durante o período de conservação, preservar a integridade das membranas e assim contribuir para manutenção da viabilidade e fertilidade do sêmen. A serina é um aminoácido com cadeias laterais polares desprovidas de carga, são abundantes no exterior de proteínas ativas em ambiente aquoso e no interior de proteínas associadas as membranas celulares sendo um dos componentes essenciais da fosfatidil-serina: importante fosfolípídeo de membrana.

Os objetivos deste trabalho foram: avaliar o efeito da adição de serina no diluente para resfriamento de sêmen canino; avaliar o efeito na cinética espermática da serina no diluente para resfriamento de sêmen canino; avaliar o efeito da adição de serina no diluente para resfriamento de sêmen canino nos parâmetros de motilidade espermática; avaliar o efeito dose dependente da adição de serina no diluente para resfriamento de sêmen canino.

2 Revisão da Literatura

O sistema genital masculino é responsável pela produção, nutrição e armazenamento de gametas masculinos e formação do plasma seminal. O plasma seminal é formado nas glândulas seminais acessórias e no epidídimo, sendo a porção líquida não celular do sêmen, veículo fluído do esperma (SENGER, 2005). O espermatozóide dos mamíferos é produzido no testículo, sendo uma célula haploide que contempla diferentes estruturas complexas e com funções específicas, recoberta por uma membrana plasmática contínua (ALBERTS, 2004; KIERZENBAUM, 2008).

Os espermatozóides não tem capacidade anabólica, sendo incapazes de produzir macromoléculas para reparo, também sendo sensíveis a alterações de pH e ao estresse oxidativo (SENGER, 2005). Sob condições naturais, o esperma é minimamente exposto a ambientes aeróbicos, reduzindo a formação de ROS e conseqüentemente seus danos. A IA expões os espermatozoides a ROS e a luz UV aumentando a chance de danos celulares e genômicos (BARAN et al., 2009).

As ROS geradas durante o metabolismo oxidativo, combinadas a outros fatores intrinsicos e extrinsicos têm sido consideradas responsáveis pela redução na motilidade e também pela diminuição da capacidade de penetração observados nas condições de conservação pela redução da temperatura (OLLERO et al., 1998; BARAN et al., 2009).

A redução da temperatura amplia o período de armazenamento do semem contribuindo para ampliar o período de viabilidade mas, ainda assim, há risco de alterações na estrutura e fisiologia celular devido ao choque térmico, danos mecânicos, estresses químicos e osmóticos do processo de conservação. Acredita-se que a cada 10°C de redução de temperatura, o metabolismo seja reduzido em 50%, sendo que a temperatura ideal para armazenamento a curto prazo é variável devido a composição das membranas.

A manutenção da fertilidade do sêmen que sofreu choque térmico ainda é fator limitante em ovinos, caprinos e caninos e ocorre devido a danos causados pelo choque térmico, exposição a temperaturas baixas, estresse osmótico e oxidativo de

forma isolada ou combinada (BEHERA et al., 2015). Mesmo que se almeje apenas a conservação a curto prazo do sêmen sob refrigeração, meios diluidores adequados devem ser utilizados (SANTOS et al., 2002).

Os lipídeos compõe cerca de 50% da massa das membranas celulares sendo o restante formado fundamentalmente por proteínas e carboidratos. Fosfolipídeos são compostos polares iônicos de natureza anfipática. São os lipídeos predominantes nas membranas celulares, sendo os responsáveis por conferir às membranas uma de suas importantes características: a fluidez, essencial para atividade celular (CHAMPE et al., 2005; ALBERTS, 2004).

Esfingomielina, fosfatidil-colina, fosfatidil-etanolamina e fosfatidil-serina são os quatro fosfolipídeos mais abundantes nas membranas biológicas. Contudo, apenas a fosfatidil-serina carrega uma carga global negativa em pH fisiológico estando geralmente presente na lâmina citosólica da bi-camada lipídica (ALBERTS, 2004). A fluidez da bicamada lipídica varia em função de sua composição e da temperatura. A redução da temperatura é capaz de promover a transição das membranas para um estado rígido bidimensional sendo denominada transição de fase (ALBERTS, 2004).

Antioxidantes presentes no meio diluente podem prevenir os danos as membranas, sequestrando ROS ou inibindo a propagação da peroxidação lipídica (BALL et al., 2001) uma vez que as membranas celulares em mamíferos são ricas em ácidos graxos polinsaturados. Estudos em esperma humano diluídos em meios contendo glutamina, prolina, histidina e betaina comprovaram a manutenção da fertilidade de espermatozoides humanos durante o processo de crioconservação e descongelamento promovido pela adição de glutamina (RENARD et al., 1996).

Li e colaboradores (2003) relatam o efeito da prolina, glutamina e glicina em sêmen de primatas não humanos, indicando o efeito positivo da adição de prolina, glicina e glutamina na motilidade dos espermatozoides, bem como na integridade do acrossoma e das membranas após o descongelamento, salientando contudo que o efeito positivo obtido depende do aminoácido e da dose agregada ao diluente.

Estudos em diferentes espécies apontaram o efeito protetor de membranas em preparações onde aminoácidos foram acrescentados aos meios de diluição dos ejaculados. A ação antioxidante da hipotaurina preveniu a peroxidação dos lipídeos e a redução da motilidade de membrana dos espermatozoides de coelho incubados em condições aeróbicas (ALAVAREZ & STOREY, 1983), diferentes concentrações

de cisteína contribuíram para preservação da motilidade e da viabilidade espermática em sêmen de carneiros após o descongelamento (UYSSAL et al., 2007).

Kundu e colaboradores (2001) avaliaram o efeito de sete aminoácidos no diluente: glicina, L-lisina, L-glutamina, L-histidina, L-prolina, L-arginina e L-alanina na motilidade de semem de bode após o descongelamento. Nesse estudo as concentrações variaram amplamente de 20 à 200mM observando que exceto lisina e arginina os demais aminoácidos proporcionaram crioproteção de forma dose dependente. Estudos posteriores realizados por Farshad e Hosseini (2013) indicaram que a adição de glutamina e prolina contribuiu para o incremento de diversos parâmetros espermáticos, incluindo motilidade progressiva e total, viabilidade bem como integridade de acrossoma e membrana plasmática contribuindo para a qualidade do sêmen antes e a pós congelamento.

Rudolph e Crowe (1985) utilizando modelos constituídos por vesículas obtidas a partir do retículo citoplasmático identificaram propriedades interessantes nas associações da prolina na formação de coloides hidrofílicos contribuindo para a manutenção da estrutura e funcionalidade das membranas durante o congelamento. Enquanto Pena e colaboradores (1998) apontaram um efeito positivo da adição de prolina em meio Tris-frutose-ácido cítrico em todas as concentrações testadas, contribuindo para a qualidade de sêmen canino após o descongelamento, Martins-Bessa e colaboradores não identificaram ganhos com a adição de taurina e hypotaurina ao diluente Uppsala Equex II nos parâmetros de motilidade, viabilidade e atividade mitocondrial em sêmen canino após descongelamento.

Aminoácidos são estruturas monoméricas capazes de se organizar unidos através de ligações do tipo amida em cadeias polipeptídicas formando estruturas tridimensionais que desempenham inúmeras funções biológicas. Os aminoácidos denominados naturais são representados no DNA por codons e exceto a prolina, apresentam um grupamento funcional amino, um grupamento funcional carboxila e uma cadeia lateral R ligados a um átomo de carbono. Aminoácidos variam em estrutura e composição química, massa molecular, constantes de ionização, ponto isoelétrico e função.

Aminoácidos com cadeias laterais polares desprovidos de carga apresentam carga líquida igual a zero em pH neutro e assim como a treonina e a tirosina, a serina (Ser ou S) possui um grupamento hidroxila capaz de estabelecer pontes de hidrogênio, massa molecular 105, constantes de ionização pK1 2,21, pK2 9,15 e

ponto isoelétrico 5,68. A serina tem uma ocorrência de 6,8% nas proteínas e a cadeia lateral da serina participa como componente importante do sítio ativo em diversas enzimas (CHAMPE et al., 2005; NELSON & COX, 2008).

Aminoácidos com cadeias laterais polares desprovidas de carga são abundantes no exterior de proteínas ativas em ambiente aquoso e no interior de proteínas associadas às membranas celulares. A serina é um aminoácido não essencial, sintetizada a partir de intermediários do metabolismo primário. A serina provém do 3-fosfoglicerato (intermediário da via glicolítica) ou também pode ser obtida a partir da glicina (CHAMPE et al., 2005).

A fosfatidil-serina é um fosfolípido de membrana que tem sua porção hidrofílica constituída por um grupamento fosfato ligado à serina. A fosfatidil-serina é necessária para a síntese das membranas celulares em mamíferos. A síntese de fosfatidil-serina ocorre através da troca de bases reversível, onde a etanolamina é substituída por serina livre (CHAMPE et al., 2005).

A sobrevivência dos espermatozoides é usualmente avaliada de forma subjetiva através da motilidade: habilidade de se mover progressivamente. Além da motilidade, o consumo de oxigênio, citometria de fluxo e sistemas (CASA) também vem sendo utilizados (SENGER, 2005).

A inseminação artificial é uma biotécnica reprodutiva corriqueira em inúmeras espécies sendo aplicada com diferentes finalidades na bovinocultura, ovinocultura, avicultura, suinocultura e também na cinofilia. Para que uma IA tenha sucesso é necessário que o sêmen seja adequadamente coletado, avaliado e preservado até sua utilização. No sêmen resfriado de 37°C à 5°C as alterações mais notáveis são específicas e relacionada a transição de fase dos lipídeos de membrana (OLLERO et al., 1998).

As avaliações iniciais ocorrem imediatamente após a coleta e incluem aspecto, volume, concentração e motilidade. Avaliação da motilidade e da morfologia são análises subjetivas resultando em variações. Sistemas automáticos para análise de sêmen (CASA) vem sendo aprimorados de forma a oferecer dados mais acurados. A motilidade acima de 60% indica a qualidade e possibilidade de uso para inseminação e resfriamento (MATOS et al., 2008; SENGER, 2005).

O sêmen pode ser conservado temporariamente através da refrigeração, contudo, para tal, deverá ser diluído (LOPES et al., 2005). A diluição e a conservação do sêmen devem proporcionar ambiente *in vitro* adequado,

minimizando a morte dos espermatozoides. O diluente deve ser isotônico, ter poder tamponante, minimizar danos pelo frio, prevenir crescimento microbiano, minimizar os danos mecânicos, ser atóxico, fornecer nutrientes necessários e ter custo baixo (SENGER, 2005; LOPES et al., 2005).

O diluente ideal é uma substância não tóxica capaz de colaborar para a manutenção da integridade das membranas dos espermatozoides, preservando a estrutura e fisiologia celular, com pequena interferência na fecundidade. A adequada composição do diluente é primordial na manutenção das características seminais em todas as etapas do processo de conservação (OLLERO et al., 1998). A possibilidade de redução do metabolismo pelo abaixamento da temperatura podem promover danos aos espermatozoides tanto na etapa de diluição e resfriamento quanto nas etapas de congelamento e descongelamento e a adição de aminoácidos agregam diferentes mecanismos de crioproteção aos aditivos classicamente utilizados nos diluentes (RENARD et al., 1996).

3 Artigo

Avaliação da adição de serina no diluente para o aprimoramento da conservação de sêmen canino em baixas temperaturas

Maria Eduarda Bicca Dode, Carine Dahl Corcini, Edenara Anastácio da Silva, Stela Meneghello Gheller, Camila Ribeiro Brito, Antonio Sérgio Varela Jr.

Submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

**AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE SERINA NO DILUENTE PARA O
APRIMORAMENTO DA CONSERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO EM BAIXAS
TEMPERATURAS**

EVALUATION OF THE ADDITION OF SERINE IN THE DILUENT FOR THE
IMPROVEMENT OF THE CONSERVATION OF CANINE SEMEN IN LOW
TEMPERATURES

Maria Eduarda Bicca Dode¹, Carine Dahl Corcini¹, Edenara Anastácio da Silva¹, Stela Meneghello Gheller¹, Camila Ribeiro Brito¹, Antonio Sérgio Varela Jr.²

ABSTRACT. Dode, M. E. D., Corcini, C., Silva, E. A., Gheller, S. M., Brito, R. C., Varela Jr, A.S. [**Evaluation of the Addition of Serine in the Diluent for the Improvement of the Conservation of Canine Semen in Low Temperatures**]. Avaliação da Adição de Serina no Diluente para o Aprimoramento da Conservação de Sêmen Canino em Baixas Temperaturas. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. Growing zootechnical and conservation demands of endangered species of canids generate the desire to improve reproductive biotechnology in canines. The conservation of semen through refrigeration promotes cellular alterations capable of interfering in the viability of spermatozoa. Thus, the addition of a suitable extender which is capable of protecting and preserving spermatozoa is essential. The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of serine in the extender medium on the sperm kinetics of cold canine semen. Twelve collections were performed, using 4 Australian Cattle Dog dogs being ejaculated with motility higher than 60% and vigor ≥ 3 . 20% Tris yolk diluents (TG) were added with addition of nine different concentrations of serine (S) from 2.5mM to 200mM S. A group without amino acid was used as control. They were analyzed in the computerized-assisted sperm motility analysis the kinetic parameters at zero hours, 24, 48 and 72 cooling at 4°C. At time zero, the following results for total (MT) and progressive motility (MP) were: in the control (63.3 and 57.6%) and in the treatment 2.5mM S (59.2 and 52.3%), 5mM S (61.1 and 55.1%), 10mM S (57, 7 and 50.1%) and 20mM S (57.9 and 50.5%). After 24 hours the parameters DAP, DCL, DSL, VAP, VCL and VSL in the control treatments (30.6, 50.7 and 25.7 μm , 67.1, 111.11 and 56.4 $\mu\text{m} / \text{s}$) and 2.5mM S (28.9, 49.2 and 24.2 μm , 64.4, 109.1 and 53.7 $\mu\text{m} / \text{s}$) were higher and in the 48 hours the MT, MP and DAP of 5mM S (47.8 e 39.7%, 22.1 μm), showed superior results to the other treatments. In the final evaluation, 72 hours, the MT in the treatment 2.5mM S (27.7%) was superior, whereas the MP did not differ in treatments 2.5mM S (18.3%) and control (17.2%) those superior to the others. All treatments above 20 mM S presented lower results than those

¹ Médico-veterinário, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Pelotas (UPEL), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Médico-veterinário, departamento de patologia animal, FURG, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

described. The addition of serine at concentrations up to 5 mM is promising for use in canine semen extender in order to maintain sperm motility parameters, the protective potential of the addition of serine in canine semen diluents being dose and time dependent.

KEY WORDS: aminoacidic, *Canis familiaris*, sperm, cooling.

RESUMO. Crescentes demandas zootécnicas e de conservação de espécies ameaçadas tem gerado a necessidade de aprimoramento de biotécnicas reprodutivas em caninos. A conservação de sêmen através da refrigeração promove alterações celulares capazes de interferir na viabilidade dos espermatozoides. Sendo assim, a adição de um diluente adequado deve ser capaz de proteger e conservar os espermatozoides. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de serina no meio diluidor sobre a cinética espermática do sêmen canino resfriado. Foram realizadas 12 coletas, utilizando 4 cães da raça Australian Cattle Dog sendo ejaculados com motilidade superior a 60% e vigor ≥ 3 . Foram testados diluentes Tris gema 20% (TG) com adição nove concentrações diferentes de serina (S) de 2,5mM a 200mM de S. Um grupo sem aminoácido foi utilizado como controle (TG0). Foram analisados no “Computerized-assisted sperm motility analysis” dos parâmetros de cinética nas horas zero, 24, 48 e 72 de resfriamento a 4°C. Na hora zero, os seguintes resultados para motilidade total (MT) e progressiva (MP) respectivamente foram: no controle (63,3 e 57,6%) e no tratamento 2,5mM S (59,2 e 52,3%), 5mM S (61,1 e 55,1%), 10mM S (57,7 e 50,1%) e 20mM S (57,9 e 50,5%). Após 24 horas os parâmetros DAP, DCL, DSL, VAP, VCL e VSL nos tratamentos controle (30,6, 50,7 e 25,7 μm , 67,1, 111,11 e 56,4 $\mu\text{m/s}$) e 2,5mM S (28,9, 49,2 e 24,2 μm , 64,4, 109,1 e 53,7 $\mu\text{m/s}$) foram superiores e nas 48 horas a MT, MP e DAP do 5mM S (47,8 e 39,7%, 22,1 μm), demonstrou resultados superiores aos demais tratamentos. Na avaliação final, 72 horas, a MT no tratamento 2,5mM S (27,7%) foi superior, já a MP não diferiu nos tratamentos 2,5mM S (18,3%) e controle (17,2%) sendo esses superiores aos demais. Todos os tratamentos acima de 20mM S apresentaram resultados inferiores aos descritos. A adição de serina em concentrações de até 5 mM são promissoras para uso em diluentes de sêmen canino visando manter os parâmetros de motilidade espermática, sendo o potencial protetor da adição de serina em diluidores de sêmen canino é dose e tempo dependente.

PALAVRAS-CHAVE: Aminoácido, *Canis familiaris*, espermatozoide, resfriamento.

INTRODUÇÃO

A cinofilia vem avançando e exigindo da medicina veterinária suporte científico e tecnológico capaz de suprir a crescente demanda de criadores e proprietários pelas biotécnicas reprodutivas. O aprimoramento de metodologias aplicáveis à caninos é o reflexo da relevância econômica e social dos cães na sociedade contemporânea pois além do valor zootécnico e de aptidões e habilidades específicas os cães podem ser utilizados como modelo experimental para outras espécies inclusive algumas ameaçadas de extinção (Pena et al., 2006), como Lobo Vermelho (*Canis rufus*), o Lobo da Etiópia (*Canis simensis*), o Cão de Caça Africano (*Licaon pictus*) bem como para espécies brasileiras, como o Lobo Guará (*Chrysocyonbrachyurus*), a Raposinha do Campo (*Pseudalopex* sp.) e o Cachorro Vinagre (*Speothos venaticus*) (Silva et al., 2000).

A técnica de resfriamento de sêmen promove a preservação temporária de gametas em baixas temperaturas, sem que se atinja o estado de quiescência. Contudo, o processo predispõe alterações intracelulares nocivas que interferem na viabilidade dos espermatozoides (Iguer-Ouada et al., 2001). A resistência térmica dos espermatozoides distingue-se entre as espécies, sendo os equinos, felinos, canídeos e humanos pouco sensíveis (Watson & Plummer, 1985; Bwanga, 1991), visto que o componente fosfolipídico da membrana celular dessas espécies proporciona uma maior estabilidade celular (Bouchard et al., 1990).

Manipulações no semen incluem resfriamento, congelamento e descongelamento dos espermatozoides e provocam mudanças na estrutura da bicamada lipídica da membrana, fazendo com que algumas proteínas livres possam se ligar a outras substâncias (Rodrigues-Martinez et al., 1993). A redução da temperatura amplia o período de armazenamento do sêmen contribuindo para ampliar o período de viabilidade mas, ainda assim, há risco de alterações na estrutura e fisiologia celular devido ao choque térmico, danos mecânicos, estresses químicos e osmóticos do processo de conservação (Khalili et al., 2010). Acredita-se que a cada 10°C de redução de temperatura, o metabolismo seja reduzido em 50%, sendo que a temperatura ideal para armazenamento a curto prazo é variável devido a composição dos lipídeos das membranas.

Para obter sucesso no resfriamento é necessário que o meio de diluição previna danos, permita a manutenção do pH, potencial iônico e osmolaridade, e contenha fonte energética (England, 1993). A manutenção da fertilidade do sêmen que sofreu choque térmico ainda é fator limitante em ovinos, caprinos e caninos e se deve aos danos causados pelo choque térmico, exposição a temperaturas baixas, estresse osmótico e oxidativo de forma isolada ou combinada (Behera et al., 2015). Mesmo que se almeje apenas a conservação a curto prazo do semen sob refrigeração, meios diluidores adequados devem ser utilizados (Santos et al., 2002).

Aminoácidos com cadeias laterais polares desprovidos de carga apresentam carga líquida igual a zero em pH neutro e assim como a treonina e a tirosina, a serina (Ser ou S) possui um grupamento hidroxila capaz de estabelecer pontes de hidrogênio. A cadeia lateral da serina participa como componente importante do sítio ativo em diversas enzimas (Champe et al., 2005; Nelson e Cox, 2008).

A fosfatidil-serina é um fosfolípido de membrana que tem sua porção hidrofílica constituída por um grupamento fosfato ligado à serina. A fosfatidil-serina é necessária para a síntese das membranas celulares em mamíferos. A síntese de fosfatidil-serina ocorre através da troca de bases reversível, onde a etanolamina é substituída por serina livre (Champe et al., 2005). Nem todos os autores relataram o efeito positivo da adição de AA no meio de resfriamento de semen, altas concentrações tornam-se prejudiciais pois induzem uma elevação da pressão osmótica causando danos celulares (Uysal et al., 2007; Pena et al., 1998).

Visto às diferenças relativas a espécie e aos indivíduos, para um maior aproveitamento do sêmen é necessário que as técnicas de conservação sejam estabelecidas e ajustadas ampliando as possibilidades de aplicação de biotécnicas reprodutivas de forma eficiente. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito imediato da adição de meio diluidor com prolina sobre a motilidade espermática e seu efeito na longevidade e motilidade do sêmen canino diluído e resfriado através da sistema “Computerized-assisted sperm motility analysis” (CASA, SpermVision®, Minitube, Tiefenbach, Alemanha).

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo os ejaculados utilizados foram obtidos de 12 coletas, realizadas em 4 cães da raça Australian Cattle Dog (1 - 3 anos), de propriedade do Canil Sentinela Farrapo, clinicamente saudáveis, com fertilidade comprovada após monta natural e rotina de coleta seminal. Todos os animais foram mantidos com as mesmas condições de alimentação e manejo. No experimento apenas ejaculados que apresentassem motilidade superior a 70% e vigor ≥ 3 foram utilizados.

Para elaboração dos meios e diluentes todos os reagentes utilizados neste experimento foram provenientes da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) e o diluente composto de Tris gema 20% (TG0) (Varela Junior et al., 2009) sem aminoácidos foi utilizado como controle. Foram testados diluentes com nove concentrações diferentes de Serina (S): TG+ 200mM S (TG200S), TG+ 100mM S (TG100S), TG+ 50mM S (TG50S), TG+ 40mM S (TG40S), TG+ 30mM S (TG30S), TG+ 20mM S (TG20S), TG+ 10mM S (TG10S), TG+ 5mM S (TG5S) e TG+ 2,5mM S (TG2,5S).

As coletas de semen foram realizadas por manipulação digital e a frequência de coleta dos cães foi de duas vezes por semana. Imediatamente após a coleta foi avaliado o volume e a concentração do ejaculado. Volume foi mensurado utilizando micropipetadora. Concentração foi determinada através da câmara de Neubauer. Os ejaculados foram então fracionados entre os 10 tratamentos e entre os quatro momentos de avaliações que seriam realizados (0h, 24h, 48h e 72h), e diluídos nos tratamentos a temperatura de 34° C na concentração final de 10×10^7 de espermatozoides/mL⁻¹. A curva de resfriamento foi realizada em caixa condicionadora (Koolmate, Minitube, Ge), com taxa de resfriamento de 0,3-0,5°C.min⁻¹ até atingir a temperatura de 5°C, permanecendo as amostras armazenadas durante 72h.

A motilidade espermática foi avaliada através sistema CASA em um microscópio óptico (Axio Scope A1®, Zeiss, Jena, Alemanha) a 200 X. O sêmen previamente diluído nos tratamentos e refrigerado foi aquecido a 37°C durante 10 minutos antes da análise de motilidade que utilizou uma alíquota de 10 µL de sêmen, avaliada entre lâmina e lamínula.

As variáveis analisadas pelo sistema foram: Motilidade total (MT) e progressiva (MP), Distancia média percorrida (DAP), Distancia Curvilínea (DCL), distancia retilínea (DSL), velocidade média de percurso (VAP), Velocidade Curvilínea (VCL), = (VSL), Retilinearidade (STR), Linearidade (LIN), wobble – oscilação (WOB), deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF). Cada amostra foi avaliada em pelo menos 6 à 10 campos escolhidos aleatoriamente, 150 à 200 espermatozoides foram avaliados em cada campo. Foi realizada a análise estatística one-way anova no software Statistix 9.0 (2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade total é um dos principais parâmetros utilizados para avaliar diluentes embora a correlação entre motilidade e viabilidade funcional do espermatozóide em caninos não esteja totalmente estabelecida (Ivanova-Kicheva et al., 1997). Como resultado deste estudo encontrou-se diferença estatística significativa na análise da motilidade espermática sendo esta dependente da concentração de serina e do período de conservação sob resfriamento analisado (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4).

A manutenção da motilidade segundo Hay et al. (1997) esta relacionada ao movimento progressivo. Quando analisado pelo sistema Casa logo após a diluição (hora zero, Tabela 1), os resultados para motilidade total e progressiva nos tratamentos TG0 (63,3 e

57,6% respectivamente), TG2,5S (59,2 e 52,3%), TG5S (61,1 e 55,1%), TG10S (57,7 e 50,1%) e TG20S (57,9 e 50,5%) apresentaram resultados superiores aos demais tratamentos. Nos parâmetros DAP, DSL, VAP e VSL analisados resultados obtido nos tratamentos TG2,5S (29,3 e 24,6 μm , 64,9 e 54,4 $\mu\text{m/s}$ respectivamente) e TG5S (31,3 e 26,3 μm , 69,8 e 58,4 $\mu\text{m/s}$) foram superiores aos demais tratamentos.

Após 24 horas (Tabela 2) de resfriamento o tratamento controle apresentou motilidade total e progressiva superiores (64,2 e 56,7%). Os parâmetros DAP, DCL, DSL, VAP, VCL e VSL nos tratamentos TG0 (30,6, 50,7 e 25,7 μm , 67,1, 111,11 e 56,4 $\mu\text{m/s}$) e TG2,5S (28,9, 49,2 e 24,2 μm , 64,4, 109,1 e 53,7 $\mu\text{m/s}$) foram significativamente superiores.

Mesmo após 48 horas (Tabela 3) de resfriamento, os parâmetros motilidade total e progressiva e DAP do tratamento contendo a concentração de serina de 5 mM (47,8 e 39,7%, 22,1 μm respectivamente), demonstrou resultados superiores aos demais tratamentos. Nos parâmetros VAP e VSL, obtivemos resultados superiores nos tratamentos TG5S (60,1 e 50,1 $\mu\text{m/s}$) e TG10S (56,8 e 47,0 $\mu\text{m/s}$).

Após resfriamento de 72 horas (Tabela 4), na avaliação demotilidade total, o tratamento TG2,5S (27,7%) foi superior, já a motilidade progressiva não diferiu nos tratamentos TG2,5S (18,3%) e TG0 (17,2%) sendo esses superiores aos demais. Já os parâmetros DAP, DCL, DSL e VAP, nos tratamentos TG0 (22,7, 41,7 e 17,9 μm e 90,8 $\mu\text{m/s}$), TG2,5S (23,4, 42,1 e 18,7 μm e 92,2 $\mu\text{m/s}$), TG5S (22,3, 41,1 e 17,8 μm e 90,4 $\mu\text{m/s}$) e TG10S (22,3, 40,8 e 17,3 μm e 86,6 $\mu\text{m/s}$) foram os que apresentados resultados superiores aos demais. Até mesmo após 72h, as amostras apresentaram viabilidade quando foi acrescentado 200mMol de serina ao diluente base Tris-gema (Tabela 4).

A figura 1 representa visualmente as curvas de motilidade total e progressiva das amostras de semen canino resfriado, tratadas com diferentes doses de serina no meio diluente em relação ao controle (dose 0) durante 48h. No tempo 0, a presença do aminoácido até 10mM não altera o percentual de motilidade total e progressiva. Observa-se a mesma tendência de curva para motilidade total e progressiva no controle e no tratamento contendo 2,5mM de serina e para os tratamentos 5 e 10mM. Após 24h de tratamento, nas concentrações de 5 e 10mM observa-se um platô com menor perda de viabilidade apontando o efeito protetor de concentrações baixas da serina no meio de diluição durante o processo de refrigeração. Valores de motilidade total e progressiva obtidos no período de refrigeração de 48h no meio diluente contendo 5mM de serina foram superiores aos observados no controle indicando um efeito protetor enquanto que após 72h o meio contendo 2,5mM de serina apresentou motilidade total significativamente superior ao controle, indicando uma ampliação da viabilidade dos espermatozóides.

Estudos em diferentes espécies apresentam resultados amplamente variáveis quanto aos aminoácidos a serem utilizados e as concentrações mais adequadas (Tuck et al., 1970; Trimeche et al., 1999; Sexton et al., 1971; Pena et al., 2004).

CONCLUSÃO

A adição de serina em concentrações de até 5 mM são promissoras para uso em diluentes de semen canino visando manter os parâmetros de motilidade espermática, sendo o potencial protetor da adição de serina em diluidores de semen canino é dose e tempo dependente. Novos estudos serão realizados buscando estabelecer a relação entre os parâmetros avaliados a eficiência funcional do semen canino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B. (4ª ED). *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463p.
- Ball, B.A.; Medina, C.; Gravance, C.G.; Baumer, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenol.*, v.56, n.4, p.577-589, 2001.
- Behera, S.; Harshan, H.M.; Bhai, K.L.; Ghosh, K.N.A. Effect of cholesterol supplementation on cryosurvival of goat spermatozoa. *Vet. World.*, v.8, n.12, p.1386-1391, 2015.
- Bouchard, G.F.; Morris, J.K.; Sikes, J.D.; Youngquist, R.S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology.*, v.34, p.147-157, 1990.
- Bwanga, C.O. Cryopreservation of boar semen. *Acta Vet. Scand.*, v.32, p.431-453, 1991.
- Champe, P.; Harvey, R.A.; Ferrier, D.R. (3a. Ed) *Bioquímica Ilustrada*. Porto Alegre: Artmed. 2005. 544p.
- England, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fertil.*, v.47, p.243-255, 1993.
- Farshad, A.; Hosseini, Y. The cryoprotective effects of amino acids supplementation on cooled and post-thaw Markhoz bucks semen quality. *Small Rum. Res.*, v.114, p.258-263, 2013.
- Hay, M.A.; King, W.A.; Gartley, C.J.; Leibo, S.P.; Goodrowe, K.L. Canine spermatozoa cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenol.*, v.48, p.1329-1342, 1997.
- Hottishead, F. Artificial insemination with canine semem. Disponível em: <http://www.matamatavets.co.nz/wp-content/themes/mvs-mobile/docs/Artificial%20Insemination%20article%202009>. Acesso em 31 de janeiro de 2018.
- Iguer-Ouada, M.; Verstegen, J.P. Long-term conservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory-prepared extenders. *Theriogenol.*, v.55, p.671-684. 2001.
- Ivanova-Kicheva, M.G.; Bobadov, N.; Somlev, B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminum tubes using three extenders. *Theriogenol.*, v.48, n.1, p.343-1.349, 1997.
- Kierszenbaum, A.L. (2a Ed). *Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia..* Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 667p.
- Khalili, B.; Jafaroghli, M.; Farshad, A.; Pareskhavi, M. The Effects of Different Concentrations of Glycine and Cysteine on the Freez ability of Moghani Ram Spermatozoa. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, v.23, n.3, p.318-325, 2010.
- Kundu, C.N.; Das, K.; Majunder, G.C. Effect Of Amino Acids On Goat Cauda Epididymal Sperm Cryopreservation Using A Chemically Defined Model System. *Cryobiology*, v.41, p.21-27, 2001.
- Li, Y.; Si, W., Zhang, W., Dinnyes, A.; Ji, W. Effect Of Aminoacids On Cryopreservation Of Cynomolgus Monkey (Macaca Fascicularis) Sperm. *Am. J. Primatol.*, v.59. p.159-165, 2003.
- Martin-Bessa, A.; Rocha, A.; Mayenco-Aguirre, A. Incorporation Of Taurine And Hypotaurine Did Not Improve The Efficiency Of The Uppsala Equex Ii Extender For Dog Semem Freezing. *Therionthol.*, v.68, p.1088-1096, 2007.

- Matos, D.L.; Araújo, A.A.; Toniolli, R.R. Análise Computadorizada De Espermatozoides: Revisão De Literatura. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v.32, n.4, p.225-232, 2008.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. (5a Ed). *Lehninger: Principles Of Biochemistry*. Nova York: W.H. Freeman And Company, 2008. 1157p.
- Ollero, M.; Perez-Pe, T.; Muino-Blanco, T.; Cebrian-Perez, A. Improvement Of Ram Sperm Cryopreservation Protocols Assesed By Sperm Quality Parameters And Heterogeneity Analysis. *Criobiol.*, v.37, p.1-12, 1998.
- Pena, A.I.; Barrio, F.; Quintela, L.A.; Herradon, P.G. Proline And Glycine Betaine In A Diluent For Freezing Canine Spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, v.33, p.5-9, 1998.
- Pena, F.J.; Núñez-Martinez, I.; Morán, J.M. Sêmen Technologies In Dog Breeding: An Uptade. *Reprod. Dom. Anim*, v.2, p.21-29, 2006.
- Renard, P.; Grizard, G.; Griveau, J.F. Improvement Of Motility And Fertilization Potential Postthaw Human Sperm Using Glutamine. *Cryobiol.*, v.33, p.311-319, 1996.
- Rodrigues-Martinez, H.; Ekwall, H.; Lindeforsberg, C. Fine Estrucure And Elemental Composition Of Fresh And Frozen Dog Spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v.47, p.279-285, 1993.
- Santos, M.R.C.; Almeida, L.E.F.; Queiroz, F.J.R. Meio Extensor Para Manutenção De Sêmem Canino Resfriado Em Contâiner Para Transporte A Longa Distância. *R. Bras.Ci. Vet.*, v.9, n.2, p.83-85, 2002.
- Senger, P.L. (3A Ed) *Pathways To Pregnancy & Parturition*. Redmon: Current Conceptions. Inc. 2012, 381p.
- Sexton, T.J.; Amann, R.P.; Flipse, R.J. Free Aminoacids And Protein In Rete Testis Fluid, Vas Deferens Plasma, Accessory Sex Gland Fluid, And Seminal Plasma Of The Conscious Bull. *J. Dairy Sci*, v.54, p.412-416, 1971.
- Silva, A.R.; Cardoso, R.C.S.; Silva, L.D.M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores a base de Tris e água de coco. *Cienc. Rural*, v.6, p.1021-1025, 2000.
- Uysal, Q.; Bucak, M.N. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet. BRNO*, v.76, p.383-390, 2007.
- Tuck, R.R.; Setchell, B.P.; Waites, G.M.H.; Young, J.A. The Composition Of Fluid Collected By Micropuncture And Catherization From The Seminiferous Tubules And Rete Testis Of Rats. *Pfliigers Arch. Eur. J. Physiol.*, v.318, p.225-243, 1970.
- Trimeche, A.; Yvon, J.M.; Palmer, E.; Magistrini, M. Effects of glutamine, proline, hidtidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenol.*, v.52, p.181-91, 1999.
- Varela Junior, A.S.; Corcini, C.D.; Ulguim, R.R. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim. Reprod. Sci*, v.11, p.323-327, 2009.
- Watson, P.F.; Plummer, J.M. The Response Of Boar Sperm Membranes To Cold Chock And Cooling. In: *International Conference On Deep Freezing Boar Semen. Proceedings*, v.1, p.113-127, 1985.

ANEXOS

Tabela 1. Efeito da adição diferentes concentrações de serina (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50 mM, 100 mM,200 mM) no diluente TG em amostras resfriadas de sêmen canino sobre parâmetros de motilidade espermática analisado pelo CASA na hora zero (Computer Assisted Sperm Analysis).

	TG0	TG2,5S	TG5S	TG10S	TG20S	TG30S	TG40S	TG50S	TG100S	TG200S
MT	63,3 ^A	59,2 ^{AB}	61,1 ^A	57,7 ^{AB}	57,9 ^{AB}	51,6 ^{BC}	44,3 ^C	46,7 ^C	27,0 ^D	15,7 ^E
MP	57,6 ^A	52,3 ^{AB}	55,1 ^A	50,1 ^{AB}	50,5 ^{AB}	43,0 ^{BC}	35,5 ^C	35,6 ^C	16,2 ^D	7,8 ^D
DAP	28,9 ^{BC}	29,3 ^{AB}	31,3 ^A	28,8 ^{BC}	28,2 ^{BC}	26,6 ^{CD}	24,5 ^{DE}	22,2 ^E	17,6 ^E	15,3 ^F
DCL	48,9 ^B	49,1 ^B	54,2 ^A	48,7 ^B	49,2 ^B	47,1 ^B	41,6 ^C	38,8 ^C	30,0 ^D	26,4 ^D
DSL	23,4 ^B	24,6 ^{AB}	26,3 ^A	23,9 ^B	22,5 ^{BC}	21,1 ^{CD}	19,6 ^D	17,3 ^E	13,6 ^F	11,7 ^F
VAP	63,7 ^B	64,9 ^{AB}	69,8 ^A	64,3 ^B	62,8 ^{BC}	58,0 ^{CD}	54,4 ^{CD}	48,5 ^E	39,1 ^F	36,1 ^F
VCL	107,5 ^B	108,5 ^B	120,4 ^A	108,3 ^B	109,5 ^B	102,7 ^C	91,8 ^C	84,6 ^C	65,9 ^D	61,4 ^D
VSL	51,5 ^B	54,4 ^{AB}	58,4 ^A	53,2 ^B	50,1 ^{BC}	46,1 ^{CD}	43,7 ^D	37,8 ^E	30,4 ^F	27,6 ^F
STR	0,794 ^{BC}	0,830 ^A	0,831 ^A	0,816 ^{AB}	0,785 ^{CD}	0,777 ^{CDE}	0,792 ^C	0,758 ^E	0,777 ^{CDE}	0,762 ^{CDE}
LIN	0,473 ^{ABC}	0,501 ^A	0,491 ^A	0,497 ^A	0,453 ^{BC}	0,443 ^C	0,485 ^{AB}	0,449 ^C	0,500 ^A	0,473 ^{ABC}
WOB	0,591 ^{BCD}	0,600 ^{ABC}	0,585 ^{BCD}	0,600 ^{ABC}	0,573 ^{AB}	0,564 ^D	0,608 ^{AB}	0,588 ^{BCD}	0,631 ^A	0,612 ^{AB}
ALH	4,17 ^{BCD}	4,24 ^{BC}	4,62 ^A	4,38 ^{AB}	4,40 ^{AB}	4,05 ^{CD}	3,85 ^{DE}	3,43 ^F	3,06 ^G	3,62 ^{EF}
BCF	20,5 ^A	17,7 ^{AB}	15,9 ^{BCD}	15,7 ^{BCD}	16,2 ^{BCD}	16,3 ^{BC}	15,2 ^{BCD}	15,3 ^{BCD}	13,3 ^{CD}	12,1 ^D

Letras distintas demonstram diferença estatística nas linhas ($P > 0.05$).

Motilidade total (MT, %), Motilidade progressiva (MP, %), Deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, μm), distância média percorrida (DAP, μm), distância curvilínea (DCL, μm), distância retilínea (DSL, μm), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), (VSL, $\mu\text{m/s}$), wobble – oscilação (WOB, $\mu\text{m/s}$).

Tabela 2. Efeito da adição diferentes concentrações de serina (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50 mM, 100 mM,200 mM) no diluente TG em amostras resfriadas de sêmen canino sobre parâmetros de motilidade espermática analisado pelo CASA nas 24 horas (Computer Assisted Sperm Analysis).

	TG0	TG2,5S	TG5S	TG10S	TG20S	TG30S	TG40S	TG50S	TG100S	TG200S
MT	64,2 ^A	55,9 ^B	51,7 ^B	40,5 ^C	28,8 ^D	39,7 ^C	29,8 ^D	28,8 ^D	20,6 ^E	18,9 ^E
MP	56,7 ^A	47,4 ^B	43,8 ^B	31,4 ^C	20,0 ^D	31,0 ^C	21,3 ^D	17,8 ^{DE}	10,9 ^E	11,5 ^E
DAP	30,6 ^A	28,9 ^{AB}	27,0 ^B	24,7 ^C	20,9 ^D	23,7 ^C	21,1 ^D	20,9 ^D	19,0 ^D	13,9 ^E
DCL	50,7 ^A	49,2 ^{AB}	45,5 ^{BC}	43,0 ^{CD}	35,1 ^F	40,8 ^{DE}	37,0 ^{EF}	36,6 ^F	34,5 ^F	20,5 ^G
DSL	25,7 ^A	24,2 ^{AB}	22,6 ^B	20,1 ^C	17,1 ^{DE}	19,0 ^{CD}	16,8 ^E	16,2 ^{EF}	14,4 ^F	11,6 ^G
VAP	67,1 ^A	64,4 ^A	59,9 ^B	54,8 ^C	47,2 ^D	53,5 ^C	46,4 ^D	46,0 ^D	42,7 ^D	33,0 ^E
VCL	111,1 ^A	109,1 ^{AB}	100,6 ^{BC}	94,8 ^{CD}	78,2 ^E	91,4 ^D	80,7 ^E	80,2 ^E	76,3 ^E	48,0 ^F
VSL	56,4 ^A	53,7 ^{AB}	50,0 ^B	44,4 ^C	38,8 ^D	43,1 ^C	37,2 ^D	35,8 ^{DE}	32,7 ^E	27,7 ^F
STR	0,831 ^A	0,826 ^{AB}	0,828 ^A	0,800 ^{BC}	0,820 ^{AB}	0,800 ^{BC}	0,792 ^{CD}	0,770 ^{DE}	0,763 ^E	0,846 ^A
LIN	0,501 ^{BC}	0,491 ^{BCDE}	0,496 ^{BCD}	0,467 ^{CDE}	0,525 ^{BC}	0,479 ^{CDE}	0,474 ^{CDE}	0,459 ^E	0,460 ^{DE}	0,632 ^A
WOB	0,600 ^{BC}	0,589 ^B	0,596 ^C	0,578 ^C	0,632 ^B	0,594 ^C	0,589 ^C	0,589 ^C	0,591 ^C	0,739 ^A
ALH	3,96 ^{AB}	4,25 ^A	3,95 ^{AB}	3,76 ^{BC}	3,65 ^{BC}	3,88 ^B	3,30 ^{DE}	3,54 ^{CD}	3,46 ^{CD}	3,02 ^E
BCF	23,4 ^A	17,2 ^B	18,0 ^B	16,7 ^B	13,0 ^{CD}	15,6 ^{BC}	17,0 ^B	16,7 ^B	15,2 ^{BC}	10,8 ^D

Letras distintas demonstram diferença estatística nas linhas (P>0.05).

Motilidade total (MT, %), Motilidade progressiva (MP, %), Deslocamento lateral de cabeça (ALH, μ m), frequência de batimento cruzado (BCF, μ m), distância média percorrida (DAP, μ m), distância curvilínea (DCL, μ m), distância retilínea (DSL, μ m), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), velocidade média de percurso (VAP, μ m/s), velocidade curvilínea (VCL, μ m/s), (VSL, μ m/s), wobble – oscilação (WOB, μ m/s).

Tabela 3. Efeito da adição diferentes concentrações de serina (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50 mM, 100 mM,200 mM) no diluente TG em amostras resfriadas de sêmen canino sobre parâmetros de motilidade espermática analisado pelo CASA nas 48 horas (Computer Assisted Sperm Analysis).

	TG0	TG2,5S	TG5S	TG10S	TG20S	TG30S	TG40S	TG50S	TG100S	TG200S
MT	38,1 ^B	36,7 ^B	47,8 ^A	39,0 ^B	25,3 ^C	28,3 ^C	23,9 ^C	23,7 ^C	10,3 ^D	9,2 ^D
MP	29,1 ^B	28,1 ^B	39,7 ^A	29,4 ^B	17,8 ^{CD}	19,5 ^C	13,2 ^D	11,8 ^D	2,6 ^E	0,9 ^E
DAP	24,5 ^{BC}	24,8 ^{ABC}	26,8 ^A	25,5 ^{AB}	22,8 ^{CD}	20,5 ^E	20,9 ^{DE}	19,6 ^E	16,8 ^F	13,1 ^E
DCL	42,9 ^{AB}	43,5 ^{AB}	45,6 ^A	43,9 ^{AB}	40,1 ^{BC}	35,3 ^D	37,0 ^{CD}	36,0 ^{CD}	29,8 ^E	19,4 ^F
DSL	20,1 ^{BC}	20,4 ^B	22,1 ^A	21,1 ^C	18,5 ^C	16,4 ^D	16,5 ^D	14,4 ^E	12,3 ^{EF}	10,1 ^F
VAP	54,1 ^{BC}	55,2 ^B	60,1 ^A	56,8 ^{AB}	50,8 ^C	46,4 ^D	46,6 ^D	43,3 ^D	37,5 ^E	35,4 ^E
VCL	94,3 ^{AB}	96,7 ^A	101,9 ^A	97,4 ^A	88,5 ^{BC}	79,6 ^D	82,0 ^{CD}	78,7 ^D	65,5 ^E	50,7 ^F
VSL	44,3 ^{BC}	45,5 ^B	50,1 ^A	47,0 ^{AB}	41,3 ^C	37,3 ^D	36,8 ^D	31,8 ^E	27,4 ^E	27,5 ^E
STR	0,809 ^{AB}	0,812 ^{ABC}	0,832 ^A	0,819 ^{AB}	0,808 ^{BC}	0,801 ^{BCD}	0,782 ^D	0,726 ^E	0,735 ^E	0,787 ^{CD}
LIN	0,466 ^{CD}	0,465 ^{CD}	0,504 ^{BCD}	0,481 ^{BCD}	0,481 ^{BCD}	0,490 ^{ABC}	0,453 ^D	0,404 ^E	0,455 ^{CD}	0,577 ^A
WOB	0,572 ^{CDE}	0,569 ^{DE}	0,601 ^{BC}	0,583 ^{BCD}	0,589 ^{BCD}	0,603 ^B	0,576 ^{BCDE}	0,550 ^E	0,609 ^B	0,716 ^A
ALH	3,86 ^{CDE}	3,94 ^{BC}	4,17 ^{AB}	3,91 ^{CD}	3,92 ^{BC}	3,78 ^{CDE}	3,63 ^E	3,65 ^{DE}	3,68 ^{CDE}	4,38 ^A
BCF	15,7 ^A	17,1 ^A	16,5 ^A	16,8 ^A	16,3 ^A	14,6 ^A	16,9 ^A	16,2 ^A	13,2 ^A	6,2 ^B

Letras distintas demonstram diferença estatística nas linhas (P>0.05).

Motilidade total (MT, %), Motilidade progressiva (MP, %), Deslocamento lateral de cabeça (ALH, μ m), frequência de batimento cruzado (BCF, μ m), distância média percorrida (DAP, μ m), distância curvilínea (DCL, μ m), distância retilínea (DSL, μ m), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), velocidade média de percurso (VAP, μ m/s), velocidade curvilínea (VCL, μ m/s), (VSL, μ m/s), wobble – oscilação (WOB, μ m/s).

Tabela 4. Efeito da adição diferentes concentrações de serina (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50 mM, 100 mM,200 mM) no diluente TG em amostras resfriadas de sêmen canino sobre parâmetros de motilidade espermática analisado pelo CASA nas 72 horas (Computer Assisted Sperm Analysis).

	TG0	TG2,5S	TG5S	TG10S	TG20S	TG30S	TG40S	TG50S	TG100S	TG200S
MT	23,8 ^B	27,7 ^A	21,6 ^B	15,5 ^C	15,4 ^C	13,8 ^C	16,3 ^C	15,9 ^C	15,8 ^C	11,9 ^C
MP	17,2 ^A	18,3 ^A	11,8 ^B	7,3 ^{CD}	5,0 ^{CD}	5,3 ^{CD}	8,2 ^C	6,3 ^{CD}	5,5 ^{CD}	1,2 ^D
DAP	22,7 ^A	23,4 ^A	22,3 ^A	22,3 ^A	18,6 ^B	17,5 ^B	19,5 ^B	18,8 ^B	17,1 ^B	7,8 ^C
DCL	41,7 ^A	42,1 ^A	41,4 ^A	40,8 ^A	32,2 ^B	30,4 ^{BC}	35,0 ^B	35,5 ^B	30,7 ^{BC}	10,2 ^D
DSL	17,9 ^A	18,7 ^A	17,8 ^A	17,3 ^A	14,2 ^B	13,1 ^B	14,6 ^B	13,7 ^B	12,6 ^B	6,5 ^C
VAP	49,7 ^{AB}	51,4 ^A	49,0 ^{AB}	47,5 ^B	41,3 ^C	39,2 ^C	43,2 ^C	40,7 ^C	39,1 ^C	16,1 ^D
VCL	90,8 ^A	92,2 ^A	90,4 ^A	86,6 ^A	70,4 ^{BC}	67,6 ^C	76,9 ^B	76,7 ^{BC}	68,4 ^{BC}	21,0 ^D
VSL	39,1 ^A	41,0 ^A	39,0 ^A	36,9 ^B	31,6 ^C	29,7 ^C	32,5 ^C	29,6 ^C	29,2 ^C	13,5 ^D
STR	0,781 ^A	0,792 ^A	0,788 ^A	0,765 ^{AB}	0,761 ^{AB}	0,758 ^{AB}	0,745 ^{AB}	0,724 ^B	0,749 ^{AB}	0,838 ^A
LIN	0,432 ^A	0,442 ^A	0,435 ^A	0,426 ^{AB}	0,464 ^{AB}	0,468 ^{AB}	0,428 ^{AB}	0,389 ^B	0,448 ^{AB}	0,680 ^A
WOB	0,549 ^{CD}	0,554 ^{CD}	0,549 ^{CD}	0,554 ^{CD}	0,601 ^B	0,610 ^B	0,568 ^C	0,535 ^D	0,588 ^{BC}	0,808 ^A
ALH	3,90 ^A	3,90 ^A	3,68 ^{AB}	3,35 ^C	3,43 ^{BC}	3,15 ^C	3,36 ^{BC}	3,07 ^C	3,63 ^{ABC}	0,67 ^D
BCF	17,4 ^A	16,7 ^A	18,0 ^A	17,8 ^A	13,9 ^{BC}	14,9 ^{ABC}	18,2 ^A	16,5 ^{AB}	19,6 ^A	9,2 ^C

Letras distintas demonstram diferença estatística nas linhas ($P > 0.05$).

Motilidade total (MT, %), Motilidade progressiva (MP, %), Deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, μm), distância média percorrida (DAP, μm), distância curvilínea (DCL, μm), distância retilínea (DSL, μm), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), (VSL, $\mu\text{m/s}$), wobble – oscilação (WOB, $\mu\text{m/s}$).

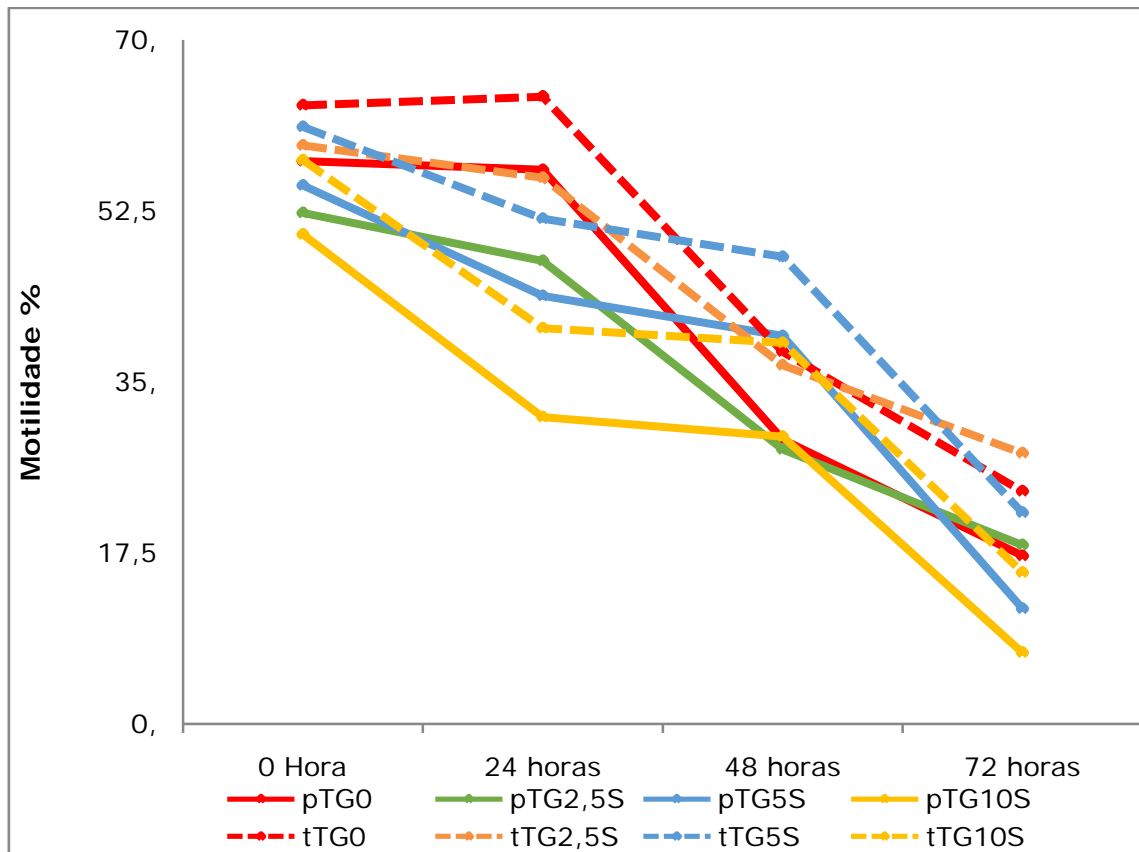


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de Serina (2,5 mM, 5 mM e 10 mM) e o controle (0), em amostras de sêmen canino, resfriados a 4°C por 72 horas sobre os parâmetros de motilidade espermática progressiva (p) e total (t) analisados no CASA (computer Assisted Sperm Analysis).

4 Considerações Finais

O sêmen canino perde a viabilidade mesmo sob refrigeração, sendo necessário a adição de um diluente capaz de suprir as demandas energéticas e proteger a estrutura e fisiologia celular do estresse oxidativo, térmico e osmótico. A serina, aminoácido polar desprovido de carga mostrou-se um aditivo promissor durante a refrigeração tendo seus efeitos dependentes da dose e do período de refrigeração. Novos estudos deverão avaliar seu potencial como aditivo para conservação do sêmen canino em temperaturas ultrabaixas.

Referências

ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463p.

BALL, B. A.; MEDINA, C.; GRAVANCE, C. G.; BAUMER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.56, n.4, p.577-589, 2001.

BEHERA, S.; HARSHAN, H. M.; BHAI, K. L.; GHOSH, K. N. A. Effect of cholesterol supplementation on cryosurvival of goat spermatozoa. **Veterinary World**, v.8, n.12, 1386-1391, 2015.

BOUCHARD, G. F.; MORRIS, J. K.; SIKES, J. D.; YOUNGQUIST, R. S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. **Theriogenology**, v.34, p.147-157, 1990.

BWANGA, C. O. Cryopreservation of boar semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.32, p.431-453, 1991.

CHAMPE., P.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 544p.

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

FARSHAD, A.; HOSSEINI, Y. The cryoprotective effects of amino acids supplementation on cooled and post-thaw Markhoz bucks semen quality. **Small Ruminant Research**, v.114, p.258-263, 2013.

HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY, C. J.; LEIBO, S. P.; GOODROWE, K. L. Canine spermatozoa cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v.48, p.1329-1342, 1997.

HOTTINSHEAD, F. Artificial insemination with canine semem. Disponível em: <<http://www.matamatavets.co.nz/wp-content/themes/mvs-mobile/docs/Artificial%20Insemination%20article%202009>> Acesso em: 31 de janeiro de 2018.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Long-term conservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory-prepared extenders. **Theriogenology**, v.55, p.671-684, 2001.

IVANOVA-KICHEVA, M. G.; BOBADOV, N.; SOMLEV, B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, v.48, n.1, p.343-1.349, 1997.

KHALILI, B.; JAFAROGHLI, M.; FARSHAD, A.; PARESH-KHIAVI, M. The Effects of Different Concentrations of Glycine and Cysteine on the Freezability of Moghani Ram Spermatozoa. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.23, n.3, p.318-325, 2010.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 667p.

KUNDU, C. N.; DAS, K.; MAJUNDER, G. C. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. **Cryobiology**, v.41, p.21-27, 2001.

LI, Y.; SI, W.; ZHANG, W.; DINNYES, A.; JI, W. Effect of amino acids on cryopreservation of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. **American Journal of Primatology**, v.59, p.159-165, 2003.

MARTIN-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. **Therionthology**, v.68, p.1088-1096, 2007.

MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; TONIOLLI, R. R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.4, p.225-232, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. 5.ed. Nova York: W.H. Freeman and Company, 2008. 1157p.

OLLERO, M.; PEREZ-PE, T.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, A. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. **Criobiology**, v.37, p.1-12, 1998.

PENA, A. I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L. A.; HERRADON, P. G. Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, p.5-9, 1998.

PENA, F. J.; NÚÑEZ-MARTINEZ, I.; MORÁN, J. M. Sêmen Technologies in dog breeding: an uptade. **Reproduction in Domestic Animals**, v.2, p.21-29, 2006.

RENARD, P.; GRIZARD, G.; GRIVEAU, J. F.; SION, B.; BOUCHER, D.; LANNOU, D. Improvement of motility and fertilization potential postthaw human sperm using glutamine. **Cryobiology**, v.33, p.311-319, 1996.

RODRIGUES-MARTINEZ, H.; EKWALL, H.; LINDEFORSBERG, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.279-285, 1993.

SANTOS, M. R. C.; ALMEIDA, L. E. F.; QUEIROZ, F. J. R. Meio extensor para manutenção de sêmem canino resfriado em contâiner para transporte a longa distância. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.9, n.2, p.83-85, 2002.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy & parturition**. 3.ed. Redmon: Current Conceptions. Inc, 2012. 381p.

SEXTON, T. J.; AMANN, R. P.; FLIPSE, R. J. Free aminoacids and protein in rete testis fluid, vas deferens plasma, accessory sex gland fluid, and seminal plasma of the conscious bull. **Journal of Dairy Science**, v.54, p.412-416, 1971.

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

TRIMECHE, A.; YVON, J. M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Effects of glutamine, proline, hidtidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.52, p.181-91, 1999.

TUCK, R. R.; SETCHELL, B. P.; WAITES, G. M. H.; YOUNG, J. A. The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v.318, p.225-243, 1970.

UYSAL, Q.; BUCAK, M. N. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. **Journal Acta Veterinaria Brno**, v.76, p.383-390, 2007.

VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; ULGUIM, R. R.; ALVARENGA, M. V.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M. N.; LUCIA, T. JR.; DESCHAMPS, J. C. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal Reproduction Science**, v.11, p.323-327, 2009.

WATSON, P. F.; PLUMMER, J. M. The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: International Conference on deep freezing boar semen, **Proceedings**, v.1, p.113 – 127, 1985.