Acta Scientiae Veterinariae, 2017. 45: 1428.

RESEARCH ARTICLE
Pub. 1428

ISSN 1679-9216

Influência da adição de vitamina E em meios diluentes na qualidade do sêmen fresco diluído, refrigerado e congelado em cães da raça Bulldog Francês

Influence of the Addition of Vitamin E in Extenders in the Quality of Fresh Semen Diluted, Refrigerated and Frozen Semen in Dogs of French Bulldog Breed

Marcelo George Mungai Chacur[1], Mariana Grandis Ripari de Souza[1], Camila Dutra de Souza[1] & Camila Pires Cremasco[2]

ABSTRACT

***Background*:** Researches have been conducted in order to maintain the quality of the fresh semen which is diluted, refrigerated or frozen in liquid nitrogen for artificial insemination purposes in dogs. The semen biotechnology cooperates with the development of new formulations of types of extenders which minimize the death of the sperms due to thermal stress during temperature reduction of the refrigeration and freezing curves of the semen. The objective was to study the influence of the addition of vitamin E in types of extenders in the quality of the fresh, refrigerated and frozen semen in dogs of French Bulldog breed.

***Materials, Methods & Results*:** Semen samples by digital manipulation were performed on 5 adult dogs, French bulldog breed, five on each dog, totaling 25 ejaculated. The characteristics evaluated in fresh semen were: Volume (mL), color, aspect, concentration (x106/mL), sperm motility (%), vigor (1-5) and sperm morphology (%). For refrigerated and frozen semen, motility (%), vigor (1-5) and morphology (%) were analyzed. The ejaculated ones were fractionated in 4 equal parts and diluted in the ratio 1: 1 in the following extenders: 1 – TRIS - Fructose Citric acid + 200 mM of vitamin E; 2 – TRIS - Fructose Citric acid; 3 - coconut water (ACP-10$^{6®}$) + 200 mM of vitamin E; and 4 – coconut water (ACP-10$^{6®}$). The four aliquots of semen, diluted in the four respective extenders were centrifuged at 1500 *g*/10 min and the "pellets" formed of sperm from every ejaculated, detached from the tubes wall were diluted homogeneously with the four extenders to the volume of 1.5 mL and filled into 0.5 mL French straws kept under refrigeration at 5ºC/4 h after placed in a nitrogen vapor at -120ºC/15 min, and immersed in liquid nitrogen at -196ºC in the sequence stored in identified racks and stored in liquid nitrogen container until the time of thawing in a water bath at 37ºC/30 s for microscopic semen analysis. Data from fresh, refrigerated and frozen semen were statistically analyzed by analysis of variance and the average compared by Tukey ($P < 0.05$). For fresh semen diluted in the four extenders, in pre-cooling curve, there was a significant difference ($P < 0.05$) for defects in the sperm head, between TRIS + vit. E (7.59 ± 4.01%) and TRIS (10.48 ± 5.42%). In the post-cooling curve to 5ºC/4 h, for the four extenders, there was no difference ($P > 0.05$) between the evaluated characteristics. For frozen semen with TRIS and thawed at 37ºC/30 s, there was difference ($P < 0.05$) for the major sperm defects, being the top average (26.62 ± 5.52%) compared to the other three extenders. For minor sperm defects in frozen semen with TRIS, there was difference ($P < 0.05$) with a lower percentage of incidence (16.23 ± 2.02%) compared to other extenders. There was difference ($P < 0.05$) with a significant increase of total defects in frozen semen with the extender ACP + vit. E, compared to other extenders.

***Discussion*:** Attention should be paid for what purpose the extenders within the refrigeration or freezing biotech will be used. In the present study, we found that the microscopic analysis of the spermatic motility and vigor in frozen semen with the ACP extender is hampered due to the lower transparency of this extender in relation to the TRIS extender. We conclude that the TRIS + vit. E extender it is the most recommended to dilute the fresh semen for the purpose of immediate artificial insemination due to lower presence of the sperm head defects. For refrigeration, the four extenders are recommended, with similarity in semen characteristics maintenance. For frozen semen the indicated extenders are the TRIS, TRIS + vit. E, and the extender ACP. The addition of vit. E in these extenders did not provide improvement of refrigerated and frozen semen, with optional use of it.

Keywords: dogs, refrigerated semen, frozen semen, vitamin E.
Descritores: cães, sêmen refrigerado, sêmen congelado, vitamina E.

Received: 27 July 2016 Accepted: 18 February 2016 Published: 10 March 2017

[1]Laboratório de Reprodução Animal, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil. [2]Faculdade de Engenharia, UNESP, Tupã, SP. CORRESPONDENCE: M.G.M. Chacur [chacur@unoeste.br -Tel.: +55 (18) 3229-2068]. Universidade do Oeste Paulista, Campus II, Rodovia Raposo Tavares, km 572. CEP 19067-175 Presidente Prudente, SP, Brazil.

INTRODUÇÃO

As biotécnicas da reprodução na espécie canina têm ganhado espaço nos procedimentos de rotina e na pesquisa [16]. A refrigeração e a congelação de sêmen são biotécnicas aplicadas à reprodução de cães [2]. A manipulação do sêmen durante o processo de refrigeração e de congelação, reduz a qualidade do mesmo devido ao estresse térmico [10], osmótico e oxidativo [4].

O meio TRIS é usado na congelação de sêmen de diversas espécies animais, incluindo a canina [8,17]. Visando desenvolver meios eficientes e de baixo custo, a eficiência da água de coco *in natura* foi estudada em meios para congelação de sêmen [6].

O estresse oxidativo é provocado pela maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), com o intuito de minimizar os efeitos deletérios ao espermatozoide, tem sido testadas a adição de antioxidantes aos meios para congelação de sêmen [2,4,20]. A vitamine E é considerada um dos antioxidantes de membrana lipossolúvel, pois protege a ligação de ácidos graxos insaturados da oxidação [3,5]. Justifica-se o presente estudo para colaborar com informações relativas à biotecnologia do sêmen, por meio do uso de novas combinações de componentes que colaboram na maximização dos resultados na pós-descongelação do sêmen da espécie. Objetivou-se estudar a influência da adição de vitamina E em meios diluentes na qualidade do sêmen fresco diluído, refrigerado e congelado em cães da raça Bulldog Francês.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais, local e colheita do sêmen

Foram utilizados cinco cães, da raça Bulldog Francês, com idades entre 1 e 5 anos. Estes foram mantidos em baias individuais em canil comercial com água *ad libitum* e alimentados 2 x / dia com ração comercial (Cibau®)[1].

O sêmen foi colhido pelo método da manipulação digital com auxilio de funil e tubos plásticos graduados. Os animais utilizados no experimento já estavam condicionados à colheita de sêmen por manipulação, pois a raça apresenta dificuldades para a realização de monta natural.

A primeira e terceira frações dos ejaculados foram desprezadas, a segunda rica em espermatozoides, utilizada para avaliação laboratorial, refrigeração e congelação em nitrogênio líquido, conforme metodologia publicada [18]. Foram colhidos e processados 25 ejaculados ao todo, cinco de cada cão.

Imediatamente após a colheita o volume do ejaculado de cada cão foi fracionado em 4 alíquotas iguais e diluídas nos respectivos meios diluentes na proporção de 1:1. Os meios utilizados foram: Meio 1 (TRIS + vit. E) - TRIS frutose ácido cítrico (3,28 g de TRIS - hidroximetil-aminometano, 1,78 g de ácido cítrico monohidratado e 1,25 g de D-frutose, dissolvidos em 100 mL de água destilada e adicionados de 20% de gema de ovo e 6% de glicerol adicionado de 200 mM de vitamina E [8]; Meio 2 (TRIS) - TRIS frutose ácido cìtrico (3,28 g de TRIS - hidroximetil-aminometano, 1,78 g de àcido cìtrico monohidratado e 1,25 g de D--frutose, dissolvidos em 100 mL de água destilada e adicionados de 20% de gema de ovo e 6% de glicerol [8]; Meio 3 (ACP + vit. E) - diluidor a base de água de coco em pó (ACP - 10[6®]) preparado de acordo com as indicações do fabricante, o diluidor contêm 20% de gema de ovo e 6% de glicerol [13] com adição de 200 mM de vitamina E; Meio 4 (ACP) - diluidor à base de água de coco em pó (ACP-106®)[2] preparado de acordo com as indicações do fabricante, o diluidor contêm 20% de gema de ovo e 6% de glicerol [13].

Diluição e transporte do sêmen

Os tubos contendo o sêmen diluído nos 4 meios (1 : 1) foram acondicionados em caixa de transporte (Botutainer®)[3] levada do canil ao Laboratório.

Refrigeração e congelação do sêmen

Cada alíquota diluída nos 4 meios foi centrifugada a 1500 *g*/10 min e os "pellets" ressuspendidos nos 4 meios de congelação. Cada um dos 4 tratamentos teve o volume final pós-diluição padronizado em 1,5 mL com envase em palhetas francesas (IMV®)[4] de 0,5 mL, mantidas em refrigerador comercial a 5ºC/4 h, após dispostas horizontalmente, expostas ao vapor de nitrogênio a -120ºC a 4 cm do nível do nitrogênio líquido por 15 min, e mergulhadas no nitrogênio liquido a -196ºC, raqueadas, identificadas e armazenadas em botijão de nitrogênio. A descongelação foi feita em banho Maria e morfologia a 37ºC/ 30 s.

Avaliações do sêmen fresco, refrigerado e congelado

As seguintes avaliações foram realizadas no sêmen: cor, aspecto, volume, concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática no sêmen fresco,

pré-curva de refrigeração, pós-curva de refrigeração e pós-descongelação, segundo normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [7].

Análise estatística

Os dados do sêmen fresco, refrigerado e congelado foram analisados estatisticamente pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

RESULTADOS

As amostras de sêmen fresco apresentaram coloração branca e aspecto viscoso. As características físicas e morfológicas avaliadas no sêmen fresco estão descritas na Tabela 1.

Na Tabela 2, comparou-se os 4 meios logo após a diluição antes da curva de refrigeração. Para motilidade não houve diferença estatística ($P > 0,05$), no parâmetro vigor, o diluente TRIS apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) com melhores resultados quando comparado ao meio ACP, nas características morfológicas o meio 2 apresentou menores porcentagens de defeitos de cabeça ($P < 0.05$) quando comparado ao meio 1.

Na Tabela 3, após a curva de refrigeração de 4 h, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) para nenhuma das variáveis avaliadas.

Após a criopreservação, Tabela 4, as características físicas não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$), mas os resultados de características morfológicas o meio 2 apresentou maiores porcentagens ($P < 0,05$) de defeitos maiores, e o meio 3 obteve diferença estatística ($P < 0,05$) com maior porcentagem de defeitos menores quando comparado aos outros 3 meios, e os meios 1 e 4 ainda obtiveram diferença estatística ($P < 0,05$) quando comparados ao meio 2. Já para defeitos totais apenas o meio 3 apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) com maiores porcentagens quando comparado aos outros meios.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão das características quantitativas e qualitativas do sêmen fresco de cães da raça Bulldog Francês.

Característica	Sêmen fresco
Motilidade (%)	86,30 ± 8,29
Vigor (1 a 5)	4,00 ± 0,60
Volume (mL)	1,67 ± 0,31
Concentração (x10^6/mL)	260,10 ± 151,72
Defeitos maiores (%)	6,83 ± 4,23
Defeitos menores (%)	13,47 ± 4,76
Defeitos totais (%)	20,31 ± 7,34
Defeito de cabeça (%)	6,76 ± 3,73
Defeito de acrossomo (%)	3,80 ± 0,18
Defeito de peça intermediária (%)	0,61 ± 0,34
Defeito de cauda (%)	12,89 ± 5,20

Tabela 2. Médias e desvios-padrão das características qualitativas do sêmen diluído de cães da raça Bulldog Francês, pré-curva de refrigeração.

	Pré-refrigeração (meios)			
Característica	TRIS+ vit. E	TRIS	ACP + vit. E	ACP
Motilidade (%)	66,96 ± 17,63 A	63,91 ± 17,51 A	66,0 9 ± 13,05 A	61,03 ± 14,56 A
Vigor (1 a 5)	3,08 ± 0,73 A	3,21 ± 0,73AB	3,04 ± 0,56 A	3,04 ± 0,56 AC
Defeitos maiores (%)	8,98 ± 7,20 A	8,68 ± 4,44 A	7,88 ± 4,91 A	10,50 ± 5,48 A
Defeitos menores (%)	14,32 ± 6,56 A	15,57 ± 8,67 A	16,69 ± 7,32 A	15,84 ± 6,73 A
Defeitos totais (%)	23,30 ± 8,97A	24,25 ± 7,72 A	24,57 ± 8,07 A	26,33 ± 9,02 A
Defeito de cabeça (%)	7,59 ± 4,01 B	10,48 ± 5,42 A	9,07 ± 5,43AB	8,65 ± 5,52 AB
Defeito de acrossomo (%)	4,60 ± 0,40 A	5,80 ± 0,38 A	6,10 ± 0,73 A	8,60 ± 1,66 A
Defeito de peça intermediária (%)	1,52 ± 5,12 A	1,72 ± 3,16 A	0,73 ± 1,51 A	2,28 ± 4,02 A
Defeito de cauda (%)	13,72 ± 6,71 A	11,47 ± 5,29 A	14,55 ± 5,59 A	14,57 ± 7,41 A

Letras (A, B, C) diferentes nas linhas, diferem entre si ($P < 0,05$). Meio 1: TRIS - frutose ácido cítrico + 200 µM vitamina E; Meio 2: TRIS - frutose ácido cítrico; Meio 3: água de coco ACP - 106 + 200 µM vitamina E; Meio 4: água de coco ACP -106.

Tabela 3. Médias e desvios padrão das características qualitativas do sêmen de cães da raça Bulldog Francês, pós-curva de refrigeração a 5ºC/4 horas.

	Pós-refrigeração			
Característica	TRIS + vit. E	TRIS	ACP + Vit. E	ACP
Motilidade (%)	52,17 ± 24,86 A	52,17 ± 22,75 A	47,83 ± 23,35 A	43,04 ± 18,69 A
Vigor (1 a 5)	2,47 ± 1,08 A	2,34 ± 1,02 A	2,34 ± 1,02 A	2,04 ± 0,82 A
Defeitos maiores (%)	11,51 ± 5,79 A	11,47 ± 5,54 A	10,07 ± 5,04 A	12,03 ± 4,76 A
Defeitos menores (%)	15,56 ± 5,74 A	15,43 ± 7,97 A	14,52 ± 5,79 A	15,13 ± 4,96 A
Defeitos totais (%)	27,07 ± 8,34A	26,90 ± 7,42 A	24,59 ± 7,27 A	27,17 ± 6,09 A
Defeito de cabeça (%)	7,75 ± 4,38 A	9,71 ± 5,50 A	8,15 ± 4,09 A	8,57 ± 4,46 A
Defeito de acrossomo (%)	0,78 ± 1,60 A	1,80 ± 2,62 A	0,70 ± 1,83 A	0,89 ± 2,51 A
Defeito de peça intermediária (%)	0,76 ± 1,78 A	0,30 ± 0,78 A	0,30 ± 1,26 A	1,18 ± 2,84 A
Defeito de cauda (%)	17,81 ± 7,54 A	14,72 ± 5,72 A	15,71 ± 6,02 A	16,09 ± 6,75 A

Letras maiúsculas iguais nas linhas, não diferem entre si ($P > 0,05$). Meio 1: TRIS - frutose ácido cítrico + 200 µM vitamina E; Meio 2: TRIS - frutose ácido cítrico; Meio 3: água de coco ACP – 106 + 200 µM vitamina E; Meio 4: água de coco ACP -106.

Tabela 4. Médias e desvios-padrão das características qualitativas do sêmen de cães da raça Bulldog Francês na pós-descongelação a 37ºC/30 segundos.

	Sêmen pós-descongelação			
Característica	TRIS + vit. E	TRIS	ACP + vit. E	ACP
Motilidade (%)	27,39 ± 22,04 A	27,83 ± 21,52 A	27,83 ± 21,52 A	20,43 ± 18,94 A
Vigor (1 a 5)	1,65 ± 1,19 A	1,56 ± 1,23 A	1,82 ± 1,26A	1,21 ± 0,99 A
Defeitos maiores (%)	15,42 ± 2,38 B	26,62 ± 5,52 A	16,37 ± 4,05 B	17,03 ± 3,98 B
Defeitos menores (%)	26,12 ± 3,03 B	16,23 ± 2,02 C	31,31 ± 3,18 A	27,48 ± 5,14 B
Defeitos totais (%)	41,54 ± 3,32 B	42,86 ± 4,94 B	47,68 ± 3,42 A	44,52 ± 6,49 B
Defeito de cabeça (%)	12,14 ± 1,54 B	12,84 ± 3,42 AB	14,44 ± 1,94 A	11,45 ± 2,00 B
Defeito de acrossomo (%)	13,02 ± 2,47 A	12,54 ± 2,93 A	12,19 ± 4,09 A	13,85 ± 3,06 A
Defeito de peça intermediária (%)	1,00 ± 0,65 A	1,29 ± 0,87 A	0,98 ± 0,60 A	0,99 ± 0,59 A
Defeito de cauda (%)	15,37 ± 1,69 C	16,72 ± 2,89 BC	20,04 ± 2,05 A	17,61 ± 2,20 B

Letras (A, B, C) diferentes nas linhas, diferem entre si ($P < 0,05$). Meio 1: TRIS - frutose ácido cítrico + 200 µM vitamina E; Meio 2: TRIS - frutose ácido cítrico; Meio 3: água de coco ACP – 106 + 200 µM vitamina E; Meio 4: água de coco ACP - 106.

DISCUSSÃO

Com relação ao sêmen fresco, os parâmetros avaliados encontram-se dentro do padrão exigido pelo colégio brasileiro de reprodução animal para cães reprodutores, podendo concluir assim que os animais utilizados no experimento são considerados aptos a reprodução.

Logo após a diluição não houve diferença entre os meios com ou sem a adição de vitamina E, similar às publicações anteriores [8,12]. Estes resultados podem estar relacionados à concentração de vitamina E utilizada, não sendo suficiente para fornecer uma proteção adicional significativa às membranas espermáticas ou a manutenção da motilidade espermática pós-descongelação [11]. Outra hipótese se baseia no estresse oxidativo do sêmen, dependente da produção pelos espermatozoides e liberação de radicais livres (ROS) no meio extracelular e do tempo de exposição, associado à temperatura, tensão de oxigênio e ambiente extracelular [1]. Os resultados de motilidade obtidos neste experimento são similares aos resultados previamente publicados [12] com meio adicionado de Vitamina E com média de 28,57 ± 15,50%.

O vigor é uma característica que descreve a qualidade da motilidade espermática [18], avaliado antes da curva e refrigeração, o diluente 2 apresentou melhores resultados quando comparado ao diluente 4, diferindo dos resultados anteriores [19] onde os meios TRIS e ACP 106® foram eficientes em conservar o vigor espermático no escore 4 (1 a 5), pós-descongelação. Os valores obtidos no presente trabalho, para vigor foram inferiores ao já descrito na literatura [19], mas similares aos observados em outra pesquisa [15]. Vale destacar que a motilidade e o vigor espermáticos são parâmetros

suscetíveis a influências externas como temperatura ambiente, condicionamento do animal para a colheita de sêmen, frequência das colheitas de sêmen e idade [9], o que explicaria a divergência dos resultados obtidos nos relatos de diversos autores. Para a relação da morfologia espermática antes da curva de resfriamento a única diferença estatística encontrada foi encontrada na porcentagem de patologias de cabeça, onde o meio 2 sem adição de vitamina E apresentou maior porcentagens deste defeito quando comparado ao diluente 1 com a adição de vitamina E. Diversas causas são relacionadas ao aparecimento deste tipo de defeitos, entre elas o estresse e aumento da peroxidação lipídica, podendo concluir então que a adição do antioxidante melhorou a conservação da morfologia espermática neste diluente antes de procedimentos que vão causar mais danos e aumento do estresse oxidativo e peroxidação lipídica.

Após as 4 h de refrigeração a 5oC, não foi encontrado mais nenhuma diferença para motilidade, vigor e para as características morfológicas avaliadas. Para motilidade os resultados foram inferiores aos relatados em outro estudo [2] com motilidade de 75,42 ± 3,45% para o grupo controle sem adição de vitamina E e 77,50 ± 3,34%, 75,42 ± 1,99% e 75,42 ± 3,16% para as respectivas concentrações de vitamina E ao meio 1, 5 e 10 mM.

Com relação à preservação da morfologia espermática após a curva de refrigeração, os quatro meios utilizados não apresentaram diferença estatística, diferindo do observado em outro trabalho que avaliou a qualidade do sêmen refrigerado com meios contendo antioxidantes, o meio com vitamina E propiciou redução dos defeitos espermáticos [14]. Podemos concluir que a concentração de vitamina E utilizada no experimento não foi suficiente para propiciar melhores resultados de conservação do sêmen canino na refrigeração. Mas os 4 diluentes utilizados apresentaram resultados após a refrigeração compatíveis com as características desejáveis para o sêmen ser usado em inseminação artificial. Resultados esses classificados como satisfatórios para inseminação artificial na espécie canina [7].

Com relação aos resultados dos 4 diluentes utilizados após a descongelação, a motilidade e o vigor não houve influência significativa com a adição do antioxidante, nos diluentes TRIS ou ACP®. Os resultados do presente estudo foram superiores a outro relato [2] que observou em relação à motilidade espermática médias de 17,33 ± 5,92%, 14,67 ± 4,03%, 21,42 ± 4,98% e 13,92 ± 4,40% para os respectivos grupos controle e suplementados com vitamina E nas mesmas concentrações descritas acima, já os valores obtidos no presente trabalho, para vigor foram inferiores à outra pesquisa [19], mas similar a outro estudo [15].

Com relação à preservação da morfologia no sêmen após a criopreservação, o meio 1 apresentou diferença estatística quando comparado aos meios 3 e 4 com menor porcentagem de defeitos espermáticos. Resultado esse que difere do obtido por outros autores [19] que utilizaram TRIS e ACP106® sem diferença estatística para os defeitos espermáticos. Não houve diferença estatística em relação a porcentagem de defeitos espermáticos para os meios com ou sem a adição de antioxidantes, corroborando outros resultados [2,12].

Para a biotécnica de refrigeração e congelação de sêmen a concentração de vitamina E utilizada nos diluentes não diminuiu os danos causados pelo choque térmico durante o processo, conforme teoria publicada [21], contrariando a hipótese de que a adição da vitamina E aos meios diluentes iria minimizar os efeitos negativos da elevada produção de ROS durante o processo de congelação do sêmen [1].

CONCLUSÃO

Conclui-se que o meio TRIS + vit. E é o mais recomendado para diluir o sêmen fresco para fins de inseminação artificial imediata devido a menor presença de defeitos de cabeça dos espermatozoides. Para a refrigeração, os quatro meios são recomendados, com similaridade na manutenção das características do sêmen. Para o sêmen congelado os meios indicados são o TRIS, TRIS + vit. E, e o meio ACP. A adição da Vit. E aos meios não propiciou melhoria do sêmen refrigerado e do sêmen congelado, sendo facultativo o uso da mesma.

MANUFACTURERS

[1]Farmina Pet. São Paulo, SP, Brazil.

[2]Vetnil Produtos Veterinários. Louveira, SP, Brazil.

[3]BotuPharma. Botucatu, SP, Brazil.

[4]IMV Technologies. L'Aigle, France.

Funding. O projeto recebeu auxílio CAPES-PROSUP.

Ethical approval. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais em Experimentação (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista, sob protocolo número 2101.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

1 **Agarwal A., Ramadan A. & Mohamed A.B. 2003.** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. 79(4): 829-843.

2 **Baptista Sobrinho C.A. 2009.** Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozoides criopreservados de cães. 74f. São Paulo, SP. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

3 **Bendich A. 1990.** Antioxidant Micronutrients and Immune Responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 587(1): 168-180.

4 **Ball B.A. & Vo A. 2001.** Osmotic tolerance of equine spermatozoa and effects on soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*. 22(6): 1061-1069.

5 **Buettner G.R. 1993.** The pecking order of free radicals and antioxidants, lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 300(2): 535-543.

6 **Cardoso R.C.S., Silva A.R. & Silva L.D.M. 2004.** Use of the alternative extender coconut water (PCW 106®) for canine semen freezing. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. (São Paulo, Brazil). pp.96-97.

7 **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). 2013.** *Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: CBRA, 83p.

8 **Coleto Z.F. 2006.** Congelação do sêmen da espécie canina adicionado de antioxidantes. 84f. Recife, PE. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

9 **Hatamoto L.K., Baptista Sobrinho C.A., Nichi M., Barnabé V.H., Barnabé R.C. & Cortada C.N.M. 2006.** Effects of dexamethasone, treatment (tomimic stress) and vitamine E oral supplementation on the spermiograman on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology*. 66(6): 1610-1614.

10 **Jasko D.J. 1994.** Procedures for cooling and freezing equine semen. *Ars Veterinaria*. 10(2): 156-165.

11 **Leite Netto M.C., Góes P.A.A., Rodrigues M.P., Cardoso P.B.S., Nichi M., Barnabé R.C. & Barnabé V.H. 2007.** Efeito da vitamina E e do levedo de cerveja na qualidade espermática de cães. In: *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal.* (Curitiba, Brasil). p.105.

12 **Lopes B.V. 2010.** Efeito da adição e/ou suplementação de antioxidante no processo de congelação/descongelação de sêmen de cães férteis e subférteis. 102f. Botucatu, SP. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

13 **Madeira V.L.H., Monteiro C.L.B., Barbosa C.C., Jucá R.P., Oliveira A.C., Uchoa D.C. & Silva L.D.M. 2010.** Efeito de diferentes protocolos de descongelação sobre o sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco em pó (ACP®). *Ciência Animal Brasileira*. 11(4): 845-852.

14 **Miester A. & Anderson L. 1983.** Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*. 52(1): 71-90.

15 **Peixoto A.L.V.A., Coleto Z.F., Morura C.S., Almeida F.C., Soares P.C., Silva S.V. & Guerra M.M.P. 2013.** Efeito da adição de trolox e glutationa reduzida na viabilidade *in vitro* de espermatozoides de cães. *Ciência Animal Brasileira*. 14(4): 436-447.

16 **Peña J., Nuñez-Martinez I. & Moran J.M. 2006.** Semen Technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals*. 41(2): 21-29.

17 **Silva A. 2002.** Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *Veterinary Journal*. 164(3): 743-751.

18 **Silva A.R., Cardoso R.C.S., Uchoa D.C. & Silva L.D.M. 2003.** Quality of canine semen submitted to single or fracionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*. 59(3): 821-829.

19 **Silva A.R., Cardoso R.C.S. & Silva L.D.M. 2006.** Comparação entre água de coco em pó (ACP®) e o TRIS como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*. 36(6): 767-774.

20 **Wang A. 1997.** Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*. 49(6): 921-925.

21 **Watson P.F. 1995.** Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*. 7(4): 871-891.