

Avaliação *in vitro* do sêmen criopreservado de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp.

[*In vitro* evaluation of cryopreserved semen of dogs naturally infected by *Leishmania* sp]

L.S. Melo Evangelista¹, Y.N.T. Carvalho¹, M.A. Castelo Branco¹, L.H.C.M. Mota¹,
F.P.S. Barçante¹, I.O.T. Souza¹, T.S. Câmara², J.A.T. Souza¹

¹Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina, PI

²Aluna de pós-graduação – Universidade Estadual do Ceará – UECE – Fortaleza, CE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade *in vitro* do sêmen criopreservado de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. Foram coletadas amostras de sêmen de 12 cães, sendo seis positivos (GI) e seis negativos (GII) para leishmaniose visceral (LV), semanalmente, totalizando quatro coletas por animal. O sêmen criopreservado foi avaliado pelo teste de termorresistência rápida (TTR), nos tempos zero, 30 e 60 minutos, pela análise computadorizada (CASA) e por meio de sondas fluorescentes; esta última técnica com o intuito de avaliar a integridade das membranas espermáticas. Houve diferença estatística pela técnica de TTR no parâmetro motilidade progressiva, no tempo 0min (68,33% GI e 72,50% GII), e no vigor espermático (2,67 GI e 3,0 GII), no tempo 30min. Quanto ao CASA, houve diferença estatística apenas na motilidade total (27,50% GI e 57,08% GII), embora os demais parâmetros seminais tenham apresentado valores relativos diminuídos nos cães do GI. Nas análises com sondas fluorescentes, foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos quanto à integridade das membranas plasmática e acrossomal e ao potencial mitocondrial das células espermáticas. Concluiu-se que a LV pode comprometer a qualidade do sêmen criopreservado de cães parasitados.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, sêmen, criopreservação, fertilidade

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* quality of cryopreserved semen of dogs naturally infected by *Leishmania* sp. 12 dog semen samples were collected, with 06 positive (GI) and 06 negative (GII) for Visceral Leishmaniasis (LV), weekly, totaling 04 collections per animal. The cryopreserved semen was evaluated by the Rapid Termorresistência Test (TTR), at 0, 30 and 60 minutes by computer analysis (CASA) and by means of fluorescent probes, the latter technique in order to assess the integrity of the sperm membrane. There was no statistical difference for the TTR technique in the progressive motility parameter, at time 0min (68.33% GI and GII 72.50%), and sperm vigor (2.67 GI and GII 3.0), time 30min. As for the CASA, there was statistical difference only in total motility (27.50% GI and GII 57.08%), although other semen parameters have submitted lower figures for GI dogs. In the analyzes with fluorescent probes statistical differences were noted between the groups in terms of plasma membrane integrity and acrosomal and mitochondrial potential of sperm cells. It was concluded that LV can compromise the quality of cryopreserved semen of infected dogs.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, sperm, cryopreservation, fertility

INTRODUÇÃO

Cães positivos para a leishmaniose visceral (LV) podem apresentar lesões no sistema reprodutivo (Diniz *et al.*, 2005; Amara *et al.*, 2009; Benites *et*

al., 2011). Além disso, processos inflamatórios preexistentes podem recrutar macrófagos contendo *Leishmania* sp., podendo causar epididimite, orquite e degeneração testicular, consequentemente reduzindo a qualidade espermática de cães com a doença (Diniz *et al.*, 2005).

Recebido em 17 de setembro de 2015

Aceito em 7 de janeiro de 2016

E-mail: luannaufpi@gmail.com

Estudos mostrando as características seminais pós-criopreservação de sêmen de cães com LV são escassos na literatura, porém diversas metodologias têm sido descritas para a congelamento do sêmen de cães saudáveis, e em todas, busca-se minimizar o dano causado ao espermatozoide pelo processamento da congelamento (Silva, 2007). A avaliação subjetiva dos parâmetros relacionados com as características morfológicas e funcionais dos espermatozoides de cães ainda vem sendo utilizada, embora com melhores resultados quando aliado a técnicas assistidas por computador e técnicas de análises de morfologia (Peña-Martínez, 2004).

A motilidade espermática é uma estimativa subjetiva da porcentagem de espermatozoides móveis de uma amostra, sendo o primeiro parâmetro e o mais utilizado para a avaliação do sêmen imediatamente após a coleta ou após a criopreservação (Cardoso *et al.*, 2005). A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é importante devido ao fato de a cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (Matos *et al.*, 2008).

A associação de métodos e técnicas de coloração tem sido uma prática necessária, visto que alguns corantes são eficientes em sensibilizar determinadas estruturas da célula espermática. O desenvolvimento de técnicas de coloração celular utilizando sondas fluorescentes para verificação do DNA, de enzimas intracitoplasmáticas, lectinas ou membranas, tem sido apontado como ferramenta auxiliar na determinação da funcionalidade do espermatozoide, após a prática de congelamento-descongelamento (Silva *et al.*, 2009).

Embora os métodos subjetivos para a avaliação dos espermatozoides do cão ainda estejam disponíveis para muitos pesquisadores, novos métodos atualmente utilizados estão sendo mais úteis para estimar a capacidade funcional dos espermatozoides, fornecendo maior padronização, precisão, confiabilidade e velocidade na obtenção dos resultados.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* as características do sêmen criopreservado de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob o número 003/2014.

Doze cães, machos, sem raça definida (SRD), foram obtidos por meio da Gerência de Controle de Zoonoses (GEZOON) da Prefeitura Municipal de Teresina, PI, e levados para os canis do Centro de Ciências Agrárias da UFPI, onde permaneceram de fevereiro a abril de 2014. Seis (06) cães com diagnóstico sorológico e parasitológico positivo para LV fizeram parte do grupo 01 (GI) e seis (06) cães negativos, do grupo 02 (GII).

Os animais foram submetidos a exame físico, exame andrológico e coleta de sêmen a cada semana, totalizando quatro semanas de coletas. Foram submetidos aos mesmos manejos sanitário e nutricional durante todo o experimento, mantidos em canis individuais, tendo acesso a solário diariamente, alimentados com ração comercial, oferecida duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

Foram incluídos neste estudo cães que possuíam os órgãos do sistema reprodutivo sem alterações detectáveis no exame físico, em condições de ejaculação, com motilidade espermática igual ou superior a 70% e vigor espermático igual ou superior a 3, a fresco.

Os exames sorológicos e parasitológicos desses cães para LV foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal (LASAN) da UFPI. As coletas de sêmen, a criopreservação, a descongelamento e as análises pós-descongelamento (Teste de termoresistência rápida – TTR e emprego de sondas fluorescentes) foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA), UFPI, no período de março a maio de 2014. A análise computadorizada do sêmen (CASA) foi realizada no Laboratório de Reprodução de Carnívoros da Universidade Estadual do Ceará (UECE), em junho de 2014.

Foi utilizado o tris-frutose-ácido cítrico como diluidor e adicionada gema de ovo (20%) para proteger a membrana plasmática espermática. Foi preparado o diluidor, acrescido de glicerol (crioprotetor), numa concentração final de 6% da

solução diluente, conforme preconizado por Lúcio (2012), preparado previamente a cada coleta.

As amostras seminais estabelecidas para cada grupo foram armazenadas em tubos Falcon de 15mL, mantidas em banho-maria até o término das coletas de sêmen do turno/dia, posteriormente acondicionadas em caixa térmica com gelo reciclável (15°C) e, em seguida, transferidas para um refrigerador até se atingir 4°C, durante 30 minutos.

Após atingir a temperatura de refrigeração, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25mL, previamente identificadas, sendo dispostas horizontalmente em rampa de congelação a uma altura de 5cm do nível de nitrogênio líquido por cinco minutos e, finalmente, armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C em *racks* identificados.

A descongelação das amostras foi realizada um mês após a congelação, por imersão das palhetas em banho-maria à temperatura de 37°C, durante um minuto (Silva *et al.*, 1998).

O teste de termorresistência rápida (TTR) foi realizado colocando-se as amostras de sêmen em frascos de eppendorf de 1,5mL, incubadas a 37°C em banho-maria e avaliadas quanto à motilidade e ao vigor espermáticos nos tempos zero, 30 e 60 minutos, sob microscopia convencional, com aumento de 100x.

A análise computadorizada do sêmen descongelado foi realizada por meio do sistema Computer-Assisted Semen Analyses (CASA), em *software* específico (Sperm Class Analyser®, Microptic S.L., versão 5.2.0). Para tanto, uma amostra de 10µL do sêmen descongelado, de cada ejaculado, foi colocada em lâmina previamente aquecida a 37°C e analisada com auxílio de microscópio de contraste de fases acoplado a uma videocâmera adaptada ao sistema. Para cada amostra, foram analisados três campos.

Entre os parâmetros avaliados foram registrados: motilidade total - MT (%), motilidade progressiva - MP (%), velocidade curvilínea - VCL (µm/s), velocidade em linha reta - VSL (µm/s), velocidade média do percurso - VAP (µm/s), linearidade - LIN (%), retilinearidade -

STR (%), índice de oscilação - WOB (%), amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide - ALH (µm) e frequência de batimento cruzado - BCF (Hz) (Silva *et al.*, 2009).

A integridade da membrana plasmática foi realizada pelo método de coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e iodeto de propídio (IP). Aliquotas de 50µL de sêmen, pós-descongeladas, foram diluídas em 150µL de TRIS contendo 5µL de DCF (0,46mg/mL em DMSO) e 20µL de IP (0,5mg/mL em PBS) e incubadas a 38°C por 10 minutos. Um total de 100 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Olimpus, Japão), com aumento de 40x, usando-se filtro de emissão DBP 580-630nm e excitação DBP 485/20nm, sendo classificados em membrana intacta, quando se apresentaram corados em verde, e em membrana danificada, quando corados em vermelho.

A função mitocondrial foi determinada pela utilização do fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie; Welch, 2006). Aliquotas de 50µL de sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150µL de TRIS contendo 5µL de JC-1 (0,15 mM em DMSO) e incubadas a 38°C por 10 minutos. Um total de 100 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência, com aumento de 40x, usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas em “alto potencial de membrana mitocondrial”, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas em “baixo potencial de membrana mitocondrial”.

Para integridade do acrossoma, aliquotas de 5µL de sêmen pós-descongelamento foram preparadas para confecção do esfregaço. Após secagem ao ar durante cinco minutos, foram armazenadas em caixas fechadas por 24 horas a 4°C (geladeira). Uma alíquota de 20µL da solução estoque de FITC-PNA (1mg/mL) foi descongelada e adicionada a 480µL de PBS para obter a concentração final de 100µg/mL. Aliquotas de 10µL desta solução foram colocadas sobre as lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida a 4°C por 20 minutos, na ausência de luz. Após a incubação, as lâminas foram mergulhadas duas vezes em PBS refrigerado (4°C) e colocadas para secagem

em caixas de isopor, na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5µL do meio de montagem (4,5mL de glicerol, 0,5mL de PBS, 5mg de azida sódica e 5mg de p-fenilenediamina a 1%) foram colocados sobre a lâmina e cobertos com laminula, sendo avaliados 100 espermatozoides por lâmina, com aumento de 100x, em microscópio de epifluorescência, usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. As células foram classificadas em portadoras de acrossomas intactos, quando apresentaram a região acrossomal corada com fluorescência verde-brilhante, ou acrossoma reagido, quando não apresentaram fluorescência verde em toda cabeça ou quando foi observada apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática.

A análise de variância foi realizada utilizando-se o programa Assistat, versão 7.7 beta (pt), seguida do teste de Tukey para comparação das médias dos parâmetros seminais para sêmen pós-criopreservação, no TTR, no CASA e nas sondas fluorescentes. Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ EPM. O nível de significância para todas as análises estatísticas realizadas foi de $P < 0,05$ (5%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a descongelação, as células espermáticas evidenciaram diferença significativa ($P < 0,05$) na motilidade progressiva entre os grupos experimentais, conforme mostra a Tab.1.

Tabela 1. Motilidade progressiva (0-100%) e vigor espermático (0-5) do sêmen fresco e descongelado de cães positivos e negativos para LV ($\chi \pm$ EMP)

Parâmetros	Sêmen fresco		Sêmen descongelado	
	GI	GII	GI	
Motilidade	80,42 $\pm$ 7,50a	87,08 $\pm$ 5,50b	68,33 $\pm$ 5,32a	72,50 $\pm$ 7,75b
Vigor	3,17 $\pm$ 1,42a	3,37 $\pm$ 3,10b	3,00 $\pm$ 0,05a	3,00 $\pm$ 0,05a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Os resultados mostraram que o sêmen pós-criopreservação dos animais do GII permaneceu com motilidade espermática dentro dos índices de normalidade para a espécie canina, diferentemente dos resultados do GI, grupo parasitado. A LV pode se disseminar por inúmeros tecidos e órgãos, caracterizando o caráter crônico da doença, e, dessa forma, macrófagos parasitados com *Leishmania* sp. podem chegar aos órgãos do sistema reprodutivo de cães, podendo alterar a qualidade seminal (Diniz et al., 2005).

Não foram encontrados resultados que demonstrassem a importância do processo de congelamento na qualidade seminal de cães infectados por *Leishmania* sp. na literatura consultada. Diversas metodologias têm sido descritas para a congelamento do sêmen de cães, e, em todas, busca-se minimizar o dano causado ao espermatozoide pelo processamento, visando recuperar um máximo possível de espermatozoides viáveis (Peña-Martínez, 2004; Silva, 2007), procedimento conferido com bastante cautela neste trabalho.

Durante a realização do teste de termorresistência (TTR) a 37°C, constatou-se redução drástica dos parâmetros de motilidade e vigor espermáticos até o término do período de incubação, havendo diferença significativa no parâmetro de motilidade progressiva, no tempo zero minuto, e no vigor espermático, no tempo 30 minutos, como pode ser observado na Tab. 2. A sobrevivência dos espermatozoides após congelamento e descongelamento parece depender das propriedades básicas da membrana plasmática, como composição bioquímica, resistência física, comportamento térmico e osmótico (De Leeuw et al., 1991). Ström et al. (1997) acreditaram que a termorresistência pós-descongelamento pode ser mais baixa para o espermatozoide canino do que para outras espécies. Esses resultados também podem ser atribuídos à variação de congelabilidade seminal individual de cada animal.

Avaliação in vitro do sêmen...

Tabela 2. Motilidade progressiva (0-100%) e vigor espermático (0-5) do sêmen descongelado de cães positivos e negativos para LV, no TTR zero, 30 e 60 minutos após a descongelação ($\chi \pm \text{EMP}$)

Parâmetros	TTR 0min		TTR 30min		TTR 60min	
	GI	GII	GI	GII	GI	GII
Motilidade	68,33 $\pm$ 5,32a	72,50 $\pm$ 7,75b	39,17 $\pm$ 9,00a	43,33 $\pm$ 19,22a	14,17 $\pm$ 5,15a	20,33 $\pm$ 18,59a
Vigor	3,00 $\pm$ 0,05a	3,00 $\pm$ 0,05a	2,67 $\pm$ 0,4a	3,0 $\pm$ 0,05b	1,75 $\pm$ 1,30a	2,00 $\pm$ 0,05a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Os resultados referentes à análise computadorizada do sêmen (CASA) encontram-se sumarizados na Tab. 3.

espermatozoides da amostra, todos os parâmetros seminais avaliados, por meio do CASA, não diferiram estatisticamente entre os grupos experimentais.

À exceção da motilidade total (MT), que se refere à proporção de células móveis do total de

Tabela 3. Cinética de espermatozoides descongelados de cães positivos e negativos para LV, avaliados por meio do CASA ($\chi \pm \text{EMP}$)

Parâmetros seminais	GI – Positivos	GII – Negativos
MT (%)	27,50 $\pm$ 20,49a	57,08 $\pm$ 18,67b
MP (%)	9,97 $\pm$ 8,90a	17,78 $\pm$ 9,02a
VCL ($\mu\text{m/s}$)	44,32 $\pm$ 16,00a	59,31 $\pm$ 17,19a
VSL (%)	29,58 $\pm$ 8,11a	37,94 $\pm$ 13,81a
VAP (%)	33,60 $\pm$ 10,59a	43,06 $\pm$ 16,33a
LIN (%)	51,97 $\pm$ 10,37a	58,78 $\pm$ 10,75a
STR (%)	75,98 $\pm$ 8,04a	82,32 $\pm$ 8,87a
WOB (%)	69,56 $\pm$ 9,45a	66,22 $\pm$ 8,55a
ALH (μm)	2,98 $\pm$ 0,70a	3,14 $\pm$ 0,89a
BCF (Hz)	10,88 $\pm$ 1,60a	11,89 $\pm$ 0,91a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

A motilidade, juntamente com a morfologia espermática, tem sido utilizada como parâmetro de avaliação de ejaculados e, assim, prediz a qualidade seminal (Verstegen *et al.*, 2002). Dessa forma, pode-se afirmar que as amostras seminais do GI apresentaram qualidade inferior ao grupo-controle, podendo resultar em baixas taxas de fertilização, se aplicadas descongeladas. Apesar da controvérsia existente a respeito da correlação entre motilidade espermática e os índices de fertilidade, são observadas diferenças significativas no padrão de movimento desempenhado por espermatozoides que alcançam altas ou baixas taxas de fertilização (Verstegen *et al.*, 2002).

A importância desses parâmetros, em especial, VCL, ALH, LIN, VAP e BCF, deve-se aos processos de hiperativação e capacitação espermática, eventos que são fundamentais para a fecundação oocitária. Algumas dessas variáveis geradas pelo CASA, como a linearidade

espermática, parecem apresentar maior correlação com a fertilidade do que os demais parâmetros (Matos *et al.*, 2008).

Assim, a associação de múltiplas variáveis de movimento geradas por meio do CASA mostra maior correlação com fertilidade em relação à utilização de apenas uma característica de movimento. Daí a importância de se associar a avaliação subjetiva com sistemas automáticos de análise seminal, fornecendo maior confiabilidade e velocidade na obtenção dos resultados.

As amostras seminais descongeladas também foram avaliadas quanto à integridade das membranas espermáticas em associação com as sondas fluorescentes IP, FITC-PNA e JC-1. Os resultados obtidos foram agrupados quanto à integridade da membrana plasmática, do acrossoma e ao potencial mitocondrial, respectivamente, detalhados na Tab. 4.

Tabela 4. Estrutura espermática de cães positivos e negativos para LV, avaliada por sondas fluorescentes ($\chi \pm \text{EMP}$)

Parâmetros	GI – Positivos	GII – Negativos
MP danificada (%)	67,17 $\pm$ 16,96a	21,50 $\pm$ 10,01b
Acrossoma danificado (%)	40,00 $\pm$ 9,26a	30,00 $\pm$ 8,13b
Baixo PM (%)	47,08 $\pm$ 19,94a	28,58 $\pm$ 13,80b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Legenda: MP – membrana plasmática; PM – potencial mitocondrial.

Os resultados revelaram que cães com LV podem ser mais susceptíveis às lesões da membrana plasmática e do acrossoma, como já revelado em outros trabalhos (Labat *et al.*, 2010). Com essas células espermáticas danificadas, o processo de fertilização fica comprometido, pois a membrana plasmática é responsável pela manutenção da homeostase celular e o acrossoma é necessário para os eventos inerentes da fertilização (Correa *et al.*, 1997).

Os resultados apresentados revelaram que, mesmo nos espermatozoides de cães com LV que apresentaram boa motilidade espermática pós-congelamento, o potencial mitocondrial foi baixo, corroborando os dados de Labat *et al.* (2010), porém, em contrapartida, os resultados de Gravance *et al.* (2001) relataram que a porcentagem de espermatozoides com alto potencial mitocondrial foi altamente correlacionada com a motilidade e a viabilidade espermática.

As mitocôndrias espermáticas estão localizadas na peça intermediária do espermatozoide, e sua principal função é realizar a fosforilação oxidativa e produzir ATP. A membrana mitocondrial interna é o local de produção dessa energia metabólica, sendo essencial para o batimento flagelar, possibilitando a propulsão e a penetração do espermatozoide no oócito (Silva e Gadella, 2006); portanto, a mitocôndria tem papel fundamental na motilidade espermática.

Quaisquer alterações nas membranas espermáticas podem provocar consequente diminuição do potencial mitocondrial (Aitken *et al.*, 1995). O efeito da oxidação sobre a arquitetura da membrana espermática e sobre o DNA mitocondrial pode ser considerado o principal fator de redução da motilidade espermática e fertilidade do sêmen,

principalmente o criopreservado (Cummins *et al.*, 1994).

O oxigênio é um elemento essencial para manutenção das funções dos espermatozoides. Porém, esse elemento pode ocasionar sérios danos à célula espermática, caso esteja presente em elevadas concentrações, o que ocorre, por exemplo, quando da elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade de ROS e/ou da redução da disponibilidade de antioxidantes, e isso pode ser causado por diversos fatores (Andrade *et al.*, 2010). As ROS podem ser causa ou consequência de várias doenças associadas ao estresse oxidativo (Ferreira e Matsubara, 1997), que também ocorre na LV, independentemente do estágio da doença.

Os danos provocados pelo excesso de ROS afetam a qualidade do sêmen, incluindo perda da motilidade de forma irreversível, inibição da respiração espermática, lesões ao DNA espermático e mitocondrial, perda de ATP e de enzimas intracelulares, o que interfere na capacidade fecundante do espermatozoide (Valença e Guerra, 2007), podendo comprometer a eficiência reprodutiva de cães com a doença.

CONCLUSÕES

Cães com leishmaniose visceral apresentam alterações seminais pós-congelamento tanto na análise subjetiva quanto na análise computadorizada, bem como na estrutura espermática, o que diminui a qualidade do sêmen criopreservado, interfere na motilidade e nas membranas espermáticas e pode, dessa forma, comprometer a fertilidade dos animais parasitados com LV.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.7, p.659-668, 1995.
- AMARA, A.; MRAD, I.; MELKI, M.K. *et al.* Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. *Rev. Med. Vét.*, v.160, p.54-60, 2009.
- ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.34, p.79-85, 2010.
- BENITES, A.P.; FERNANDES, C.E.; BRUM, K.B.; ABDO, M.A.G.S. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.31, p.72-77, 2011.
- CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.29, p.179-187, 2005.
- CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination programs. *Theriogenology*, v.48, p.721-731, 1997.
- CUMMINS, J.M.; JEQUIER, A.M.; KAN, R. Molecular biology of the human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Mol. Reprod.*, v.37, p.345-362, 1994.
- DE LEEUW, F.E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Domest Anim.*, v.1, p.95-104, 1991.
- DINIZ, S.A.; MELO, M.S.; BORGES, A.M. *et al.* Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.*, v.42, p.650-658, 2005.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.43, p.1-16, 1997.
- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; MILLER, M.G. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod. Toxicol.*, v.15, p.5-10, 2001.
- LABAT, E.; CARREIRA, J.T.; MATSUKUMA, B.H. *et al.* Qualidade espermática de sêmen de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, p.609-614, 2010.
- LÚCIO, C.F. Efeito da glutatona reduzida (GSH) na criopreservação de espermatozoides da espécie canina: avaliação *in vitro* e *in vivo*. 2012. 116f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.32, p.225-32, 2008.
- PEÑA-MARTINEZ, I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Scien.*, v.82, p.209-224, 2004.
- SILVA, A.R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, p.119-127, 2007.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Efeito do processo de descongelamento sobre a viabilidade do sêmen canino *in vitro*. *Ciênc. Anim.*, v.8, p.75-80, 1998.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.
- SILVA, S.V.; BATISTA, A.M.; COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P. Diferentes métodos e técnicas na avaliação espermática: Uma breve revisão. *Ciênc. Vet. Tróp.*, v.12, p.1-15, 2009.
- STRÖM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*, v.48, p.247-256, 1997.
- VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, p.47-53, 2007.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-79, 2002.