

Efeito da administração via oral de selênio e vitamina E na qualidade do sêmen fresco, refrigerado e congelado em cães da raça Bulldog Francês

Effect of Oral Administration of Selenium and Vitamin E on the Quality of Fresh, Refrigerated and Frozen Semen in French Bulldog Breed Dogs

Marcelo George Mungai Chacur¹, Mariana Grandis Ripari de Souza¹,
Camila Dutra de Souza¹ & Camila Pires Cremasco²

ABSTRACT

Background: New methodologies have been developed seeking to maximize pregnancy rate in female dogs created in commercial kennels, and also in order to maintain the quality of canine semen after dilution, refrigeration or freezing. One of the main factors that generate damage to sperm is oxidative stress, to minimize sperm damage, selenium and antioxidants like vitamin E are administered, by oral administration, seeking to improve the quality of semen. The objective was to study the effect of vitamin E and selenium, by oral administration, in the quality of fresh, refrigerated and frozen semen in adult dogs French Bulldog breed.

Materials, Methods & Results: Semen samples were collected from 5 adult dogs, French Bulldog breed, being 2 semen drawing before the daily oral supplementation with vitamin E and selenium (ESE®) and semen drawing at 20, 40 and 60 days after the beginning of oral supplement. The ejaculated samples were diluted in TRIS - fructose citric acid (3.28 g TRIS-hydroxy-methyl-amino-methane, 1.78 g of citric acid monohydrate and 1.25 g of D - fructose, dissolved in 100 mL of distilled water and added of 20% egg yolk and 6% of glycerol. The characteristics evaluated in fresh semen were: volume (mL), color, appearance, concentration (x10⁶ / mL), sperm motility (%), sperm strength (1 to 5) and morphology (%). For refrigerated and frozen semen were analyzed: sperm motility (%), sperm strength (1-5) and morphology (%). Diluted semen samples were centrifuged at: 1500 g/10 min and "pellets" formed by sperm of each ejaculated, detached from the tube wall were diluted homogeneously in the diluent TRIS type up to the final volume of 1.5 mL. After that, packaged in 0.5 mL French straws, kept under refrigeration at 5°C/4 h, placed in nitrogen vapor at -120°C/15 min, and dipped in liquid nitrogen at -196°C and then stored on identified rachis and stored in liquid nitrogen container until the time of thawing in water bath at 37°C/30 s for semen microscopic analysis. Data from fresh, refrigerated and frozen semen were statistically analyzed by analysis of variance and the average compared by 5% of Tukey test. Fresh semen sperm concentration differed ($P < 0.05$) between the samples, rising after 40 days after the beginning of oral supplementation with selenium and vitamin E. For the spermatid strength, better score ($P < 0.05$) was observed at collection 4, in 40 days after the beginning of oral supplementation to dogs. For fresh and refrigerated semen, the total defects, defects of head, acrosome and tail did not differ ($P > 0.05$) between the samples. Total sperm defects and minor head and tail defects did not differ ($P > 0.05$) between the samples in post-thawing. Regarding the acrosome defects after thawing, there was a significant reduction ($P < 0.05$) in samples performed 40 and 60 days after the beginning of oral supplementation with selenium and vitamin E.

Discussion: Attention should be paid for what purpose the extenders within the refrigeration or freezing biotech will be used. The managed supplement, by oral administration, containing selenium and vitamin E, influenced beneficially raising the sperm concentration in fresh semen and decreasing the acrosome defects in frozen semen. Oral administration of supplementation with selenium and vitamin E is recommended for improving the quality of fresh and frozen semen in dogs.

Keywords: dogs, nutritional supplement, antioxidant, frozen semen, semen analysis.

Descritores: cães, suplemento nutricional, antioxidante, sêmen congelado, análise de sêmen.

INTRODUÇÃO

A refrigeração e a congelamento de sêmen são aplicadas à reprodução de cães, permitindo que o sêmen seja armazenado durante períodos de horas até anos [5,20]. A manipulação do sêmen na refrigeração e congelamento, reduz a qualidade do mesmo devido a lesões estruturais e funcionais advindas do estresse térmico [11], osmótico e oxidativo [6].

Um dos fatores que geram danos aos espermatozoides criopreservados são causados pelo estresse oxidativo [6,25], devido ao alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, presentes na membrana plasmática [2]. Uma alternativa para reduzir os danos provocados pelo estresse oxidativo aos espermatozoides é a administração oral de antioxidantes [13].

A vitamina E é um antioxidante de membrana lipossolúvel, protege a ligação de ácidos graxos insaturados da oxidação [4,10]. O selênio atua na atividade reprodutiva, mantém a integridade da membrana

plasmática, eleva a motilidade e a probabilidade de fertilização [22,24]. Justifica-se o estudo para colaborar com informações relativas ao uso de suplemento oral com selênio e vitamina E; e sua influência na qualidade do sêmen fresco ou utilizado em refrigeração ou congelamento. Objetivou-se estudar o efeito da vitamina E e selênio, administrados via oral, na qualidade do sêmen fresco, refrigerado e congelado em cães adultos da raça Bulldog Francês.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais, alimentação e local do experimento

Foram utilizados cinco cães, da raça Bulldog Francês, com idades entre 1 e 5 anos, mantidos em baias individuais em canil comercial com água *ad libitum* e alimentados 2 x / dia com porção de 110 g de ração comercial¹, com formulação descrita na Tabela 1, conforme preconizado pelo NRC (2006) [19].

Tabela 1. Valores em quilocalorias (Kcal) e miligramas (mg) de vitamina E e selênio preconizados e fornecidos aos cães, conforme recomendado pelo NRC, 2006.

	Exigência/dia* (NRC, 2006)	Fornecido por Kg da ração	Fornecido por cão 220g/dia	Fornecido pelo suplemento/mL	Ingestão total/ dia
Kcal	888	4020	884.4	_____	884,4
Vitamina E (mg)	80	894	196,68	125	696,68
Selênio (mg)	0,09	0,18	0,03	0,075	0,33

*Cães reprodutores com peso em torno de 10 kg.

Colheita e processamento do sêmen

O sêmen foi colhido pelo método da manipulação digital com auxílio de funil e tubos plásticos graduados. A primeira e terceira frações do ejaculado foram desprezadas, a segunda rica em espermatozoides, utilizada para avaliação e criopreservação, conforme Silva *et al.* [23]. Foram colhidos e processados um total de 25 ejaculados, cinco de cada cão. O experimento foi dividido em duas fases: Fase 1: com duas colheitas de sêmen, de cada um dos cinco cães, antes da administração oral diária do suplemento com selênio e vitamina E; e Fase 2: com três colheitas de sêmen, de cada um dos cinco cães, nos momentos 20, 40 e 60 dias, após o início da administração oral diária do suplemento com selênio e vitamina E.

Fase 1 do experimento

Na fase 1 do experimento, foram realizadas duas colheitas de sêmen, com intervalo de sete dias,

de cada um dos cinco cães, antes da administração oral diária do suplemento com selênio e vitamina E. Os ejaculados foram avaliados macroscopicamente e microscopicamente e congelados em nitrogênio líquido. Os ejaculados de cada cão foram diluídos no meio TRIS - frutose ácido cítrico (3,28 g de TRIS - hidroximetil-amino-metano, 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 [8,15].

Fase 2 do experimento

Na fase 2 do experimento, foram realizadas três colheitas de sêmen, de cada um dos cinco cães, nos momentos 20, 40 e 60 dias, após o início da administração oral diária do suplemento com selênio e vitamina E2 (ESE®) na dose de 4 mL/10 kg de peso vivo. Nessa dosagem do suplemento cada animal re-

cebeu 500 mg de vitamina E e 0,3 mg de selênio. Os ejaculados foram avaliados quanto às características quantitativas e qualitativas [7] e diluídos em meio TRIS - frutose ácido cítrico.

Diluição e transporte do sêmen

Imediatamente após a colheita de cada ejaculado, o volume de sêmen foi incubado em banho-maria a 37°C, e diluído na proporção de 1:1 com o meio TRIS. Os tubos contendo o sêmen diluído (1:1) foram acondicionados em caixa de transporte³ (Botutainer®) levada do canil ao Laboratório.

Refrigeração e congelamento do sêmen

A diluição (1:1) foi centrifugada a 1500 g/10 min e os “pellets” ressuspensos na mesma formulação de meio TRIS, com envase em palhetas francesas⁴ de 0,5 mL, mantidas em refrigerador comercial a 5°C/4 h, após dispostas horizontalmente, expostas ao vapor de nitrogênio a -120°C a 4 cm do nível do nitrogênio líquido por 15 min, e mergulhadas no nitrogênio líquido a -196°C, raqueadas, identificadas e armazenadas em botijão de nitrogênio. A descongelamento foi feita em banho Maria e morfologia a 37°C/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-descongelamento, segundo normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [7].

Tabela 2. Médias e desvio-padrões para volume e concentração espermática do sêmen fresco de cães da raça Bulldog Francês, as colheitas 1 e 2 foram feitas antes da administração oral de vitamina E e selênio e as colheitas 3, 4 e 5 foram, respectivamente, aos 20, 40 e 60 dias após o início da administração oral de vitamina E e selênio.

Variável	Colheita	Sêmen fresco
Volume (mL)	1	1,80 ± 0,27A
	2	1,78 ± 0,34A
	3	1,30 ± 0,44A
	4	1,87 ± 0,25 A
	5	1,62 ± 0,25 A
Concentração (x10 ⁶ /mL)	1	182,10 ± 80,50 B
	2	241,40 ± 202,60 B
	3	194,50 ± 122,90 B
	4	362,50 ± 121,60 A
	5	320,00 ± 231,00A

Letras distintas (A, B) nas colunas, diferem entre si ($P < 0,05$).

Análise estatística

Os dados das características do sêmen fresco, refrigerado e congelado foram submetidos a análise de variância com posterior comparação entre médias pelo teste de Tukey a 5%.

RESULTADOS

A concentração espermática do sêmen fresco diferiu ($P < 0,05$) entre colheitas, elevando-se a partir dos 40 dias após o início da administração oral do suplemento com selênio e vitamina E. Para o vigor espermático, melhor escore ($P < 0,05$) foi observado na colheita 4, aos 40 dias após o início da administração oral do suplemento aos cães (Tabelas 2 e 3). Para o sêmen fresco e refrigerado, os defeitos totais, defeitos de cabeça, acrossomo e cauda não diferiram ($P > 0,05$) entre colheitas. Defeitos espermáticos totais e defeitos menores de cabeça e cauda não diferiram ($P > 0,05$) entre colheitas na pós-descongelamento. Com relação aos defeitos de acrossomo pós-descongelamento, houve redução significativa ($P < 0,05$) nas colheitas realizadas 40 e 60 dias após o início da administração oral do suplemento com selênio e vitamina E (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Os cães se adaptaram de forma rápida ao manejo de colheita de sêmen pelo método da manipulação digital. Com relação ao sêmen fresco, não houve influência do suplemento com vitamina E; e selênio, administrado via oral, no volume do ejaculado, similar ao relatado anteriormente [22].

Tabela 3. Médias e desvio-padrões da motilidade e vigor espermáticos de cães da raça Bulldog Francês, as colheitas 1 e 2 foram feitas antes da administração oral de vitamina E e selênio e as colheitas 3, 4 e 5 foram, respectivamente, aos 20, 40 e 60 dias após o início da administração oral de vitamina E e selênio.

Variável	Colheita	Fresco	Refrigerado	Congelado
Motilidade (%)	1	85,00 ± 10,00 Aa	26,67 ± 27,99 Ab	15,50 ± 21,64 Ac
	2	85,00 ± 7,07 Aa	31,46 ± 29,84 Ab	12,00 ± 16,42 Ac
	3	89,00 ± 5,48 Aa	31,24 ± 27,44 Ab	27,00 ± 15,59 Ac
	4	87,50 ± 11,90 Aa	42,15 ± 33,78 Ab	39,38 ± 18,79 Ac
	5	85,00 ± 10,00 Aa	41,83 ± 33,27 Ab	40,00 ± 17,13 Ac
Vigor (1 a 5)	1	3,60 ± 0,54 Aa	2,15 ± 1,09 Ab	0,85 ± 1,13 Ac
	2	4,40 ± 0,54 ABa	2,25 ± 0,98 ABb	0,75 ± 0,96 Abc
	3	4,00 ± 0,00 BCa	2,82 ± 0,50 BCb	2,00 ± 0,97 BCc
	4	4,25 ± 0,95 Ca	3,15 ± 0,62 Cb	2,37 ± 0,88 Cc
	5	3,75 ± 0,50 BCa	3,094 ± 0,818 BCb	2,12 ± 0,88 BCb

Letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas diferentes na coluna ($P < 0,05$).

Na espécie canina, o volume do ejaculado apresenta variações devido às diferenças individuais como idade, tamanho da próstata e frequência de ejaculação [9], devido a este fato, optou-se por utilizar a segunda fração do ejaculado, rica em espermatozoides.

A concentração espermática do sêmen fresco aumentou, corroborando prévia publicação [10] onde foi administrada vitamina E em cães. Os resultados para a concentração também foram similares a outro artigo [22] em cães, 60 dias após o início da administração de suplementação com selênio.

Estudos em humanos, concluíram que pacientes com problemas reprodutivos apresentam alto teor de ROS no sêmen, o que causa elevação na porcentagem de espermatozoides com alteração morfológica na presença de oligozoospermia, provavelmente por aumentar a taxa de apoptose ainda durante a espermatogênese, infere-se que diminuindo os teores de ROS ou aumentando o sistema antioxidante com vitamina E, diminui-se o estresse oxidativo e os danos aos espermatozoides [8].

A deficiência de selênio influencia na síntese de fosfolipídio hidroperóxido glutatona peroxidase (PH-GSH-Px), resultando no aumento de defeitos morfológicos na cabeça, cauda e peça intermediária, com redução da concentração espermática [3].

Com relação ao uso do suplemento, via oral e seus efeitos sobre a motilidade, o presente trabalho corrobora os resultados de experimentos similares [10,14,22,27]. Por outro lado, o efeito da suplementação oral em cães com vitamina E foi avaliado, relatando

aumento da motilidade espermática no sêmen fresco [12]. Estes resultados podem estar relacionados à concentração dos antioxidantes utilizados, não sendo suficiente para fornecer uma proteção adicional significativa às membranas espermáticas ou a manutenção da motilidade espermática pós-descongelamento [12].

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].

O vigor é uma característica que descreve a qualidade da motilidade espermática [23], na comparação realizada antes e durante o uso do suplemento nutricional, houve aumento do vigor espermático no sêmen fresco, refrigerado e congelado, aos 40 dias após o início da oferta do suplemento oral. Resultado esse similar ao de outros pesquisadores [10] que utilizaram animais submetidos à condição de estresse e suplementados com vitamina E. No presente estudo, os resultados foram similares aos divulgados anteriormente [16,18] que avaliaram sêmen fresco de cães, antes e depois do uso do suplemento oral, onde não houve influência significativa no vigor espermático.

Entre colheitas, foram observados os dados referentes à morfologia espermática onde a porcentagem de defeitos maiores foi menor, apresentando diferença significativa sêmen após descongelamento, diferindo dos resultados publicados por outro grupo de pesquisa [22]. Porém, os resultados encontrados

Tabela 4. Médias e desvio-padrões dos defeitos espermáticos de cães da raça Bulldog Francês, as colheitas 1 e 2 foram feitas antes da administração oral de vitamina E e selênio e as colheitas 3, 4 e 5 foram, respectivamente, aos 20, 40 e 60 dias após o início da administração oral de vitamina E e selênio.

Variável	Colheita	Fresco	Refrigerado (meio TRIS)	Congelado (meio TRIS)
Defeitos maiores (%)	1	7,83 ± 2,20 ABc	12,39 ± 5,53 Ab	20,25 ± 5,72 Aba
	2	10,3 ± 4,71 ABc	10,66 ± 5,86 ABb	21,20 ± 5,71 Aa
	3	4,41 ± 3,34 Bc	7,28 ± 4,14 Bb	20,77 ± 7,31 Aa
	4	7,60 ± 5,08 ABCc	7,08 ± 3,70 Bb	16,12 ± 4,60 ABCa
	5	3,51 ± 2,79 Bc	13,28 ± 5,13 Ab	14,57 ± 3,42 BCDA
Defeitos menores (%)	1	13,82 ± 5,59 Ab	16,10 ± 7,35 Ab	24,91 ± 6,12 Aa
	2	13,80 ± 2,85 Ab	13,72 ± 7,20 Ab	26,31 ± 7,77Aa
	3	11,42 ± 5,67 Ab	14,82 ± 7,37 Ab	25,34 ± 6,75 Aa
	4	17,26 ± 3,43 Ab	17,765 ± 5,557 Ab	25,62 ± 6,24 Aa
	5	11,44 ± 5,23 Ab	14,88 ± 4,84 Ab	24,10 ± 6,27 Aa
Defeitos totais (%)	1	21,65 ± 6,10 Ab	28,50 ± 8,27 Ac	45,16 ± 5,30 Aa
	2	24,10 ± 4,26 Ab	24,38 ± 6,71Ac	47,51 ± 5,15 Aa
	3	15,82 ± 7,08 Ab	22,10 ± 9,24 Ac	46,11 ± 2,60 Aa
	4	24,86 ± 8,14 Ab	24,85 ± 6,47 Ac	41,73 ± 2,82 Aa
	5	14,95 ± 7,86Ab	28,17 ± 6,29 Ac	38,67 ± 4,23 Aa
Defeito de cabeça (%)	1	6,99 ± 5,04 Ab	9,89 ± 5,25 Ab	13,26 ± 2,96 Aa
	2	8,70 ± 1,92 Ab	6,69 ± 4,57 Ab	12,99 ± 1,91 Aa
	3	6,14 ± 4,19 Ab	8,58 ± 5,86 Ab	13,37 ± 1,93 Aa
	4	6,55 ± 3,18 Ab	10,18 ± 3,72 Ab	12,16 ± 3,04 Aa
	5	5,06 ± 4,35 Ab	8,66 ± 3,68 Ab	11,42 ± 2,58 Aa
Defeito de acrosomo (%)	1	0,00 ± 0,00Ab	0,14 ± 0,41 Ab	14,87 ± 2,25 Aa
	2	0,17 ± 0,39 Ab	1,15 ± 2,04 Ab	14,88 ± 2,14 Aa
	3	0 ± 0 Ab	1,01 ± 2,62 Ab	14,16 ± 2,46 Aa
	4	0 ± 0 Ab	0,25 ± 0,56 Ab	9,69 ± 1,73 Ba
	5	0 ± 0 Ab	1,39 ± 1,77 Ab	9,60 ± 2,05 Ba
Defeito de peça intermediária (%)	1	2,13 ± 2,93 Aa	3,04 ± 5,30 Aa	1,25 ± 0,63 Aa
	2	0,32 ± 0,73 Ba	0,32 ± 0,73 Ba	0,82 ± 0,58 Ba
	3	0 ± 0 ABa	0 ± 0 ABa	1,04 ± 0,59 Aba
	4	0 ± 0 ABa	0,91 ± 1,72 ABa	1,37 ± 0,85 Aba
	5	0,45 ± 0,90 ABa	1,21 ± 2,15 ABa	0,88 ± 0,70 Aba
Defeito de cauda (%)	1	12,53 ± 4,34 Ab	15,42 ± 6,92 Ab	16,38 ± 2,72 Aa
	2	14,89 ± 3,23 Ab	16,32 ± 6,55 Ab	18,08 ± 2,43 Aa
	3	9,68 ± 5,73 Ab	12,41 ± 5,88 Ab	17,53 ± 2,24 Aa
	4	18,31 ± 4,97 Ab	13,19 ± 6,58 Ab	18,50 ± 2,56 Aa
	5	9,44 ± 3,43 Ab	16,90 ± 5,78 Ab	16,75 ± 3,73 Aa

Letras distintas minúsculas (a, b, c) nas linhas e maiúsculas (A, B, C) nas colunas, diferem entre si ($P < 0,05$).

neste trabalho são similares quanto ao uso da vitamina E, via oral para reduzir a porcentagem de defeitos maiores na espécie canina [10]. Os efeitos da vitamina E na morfologia espermática são controversos, entretanto, a literatura descreve que doses acima de 20 vezes o requerimento diário desta vitamina, promovem efeito deletério na morfologia espermática, cujo mecanismo de ação necessita ser elucidado [10].

No presente trabalho, nas colheitas 4 e 5 aos 40 e 60 dias, respectivamente, após o início da administração, via oral, do suplemento houve diminuição da porcentagem de defeitos do acrossomo. Esses resultados são explicados levando-se em consideração às seguintes colocações citadas na literatura: com relação aos defeitos de acrossomo, essa é uma das regiões do espermatozoide mais susceptíveis aos danos causados pelo choque térmico durante o processo de congelamento [26], devido à alta porcentagem de ácidos graxos polinsaturados presente nas membranas [21].

Espera-se maior porcentual de células com acrossomos íntegros após o uso dos antioxidantes [17]. Minimizando os efeitos negativos da elevada produção de ROS durante o processo de congelamento do sêmen [1].

CONCLUSÃO

A administração via oral de vitamina E e selênio influenciou de forma benéfica a qualidade do sêmen com aumento da concentração espermática no sêmen fresco e redução dos defeitos do acrossomo no sêmen congelado. Recomenda-se administrar via oral vitamina E e selênio, em cães utilizados para monta natural e para doadores de sêmen para congelamento.

MANUFACTURERS

¹Farmina Pet Foods Brasil. São Paulo, SP, Brazil.

²Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda. Louveira, SP, Brazil.

³BotuPharma Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda. Botucatu, SP, Brazil.

⁴IMV 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 **Agarwal A., Prabakaran S. & Allamaneni S. 2006.** What an andrologist / urologist should know about free radicals and why. *Urology*. 67(1): 2-8.
- 3 **Alvim F. & Souza G.M. 2005.** Influência dos principais microminerais na reprodução de bovinos (Parte final). Disponível em: <http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1006>. [Accessed February 2016].
- 4 **Bendich A. 1990.** Antioxidant Micronutrients and Immune Responses. *Annals of New York Academy of Sciences*. 587(1): 168-180.
- 5 **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.
- 6 **Ball B.A. & VO A. 2001.** An 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.
- 7 **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). 2013.** *Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: CBRA, 83p.
- 8 **Coletto Z.F. 2006.** Congelamento 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 **Cunha I.C.N. 2002.** Criopreservação do sêmen de cães. 149f. Botucatu, SP. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

- 10 **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 vitamin E oral supplementation on the spermogram on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology*. 66(6): 1610-1614.
- 11 **Jasko D.J. 1994.** Procedures for cooling and freezing equine semen. *Ars Veterinaria*. 10(2): 156-165.
- 12 **Leite Netto M.C., Góes P.A.A., Rodrigues M.P., Cardose P.B.S., Nichi M., Barnabe R.C. & Barnabe 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.
- 13 **Lenzi A., Picardo M., Gandini L., Lombardo F., Terminalli O., Passi S. & Dondero F. 1994.** Glutathione treatment of dispermia: effect on the lipoperoxidation process. *Human Reproduction*. 9(11): 2044-2050.
- 14 **Lopes B. V. 2010.** Efeito da adição e/ou suplementação de antioxidante no processo de congelamento/descongelamento de sêmen de cães férteis e subférteis. 102 f. Botucatu, SP. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- 15 **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 descongelamento sobre o sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco em pó (ACP®). *Ciência Animal Brasileira*. 11(4): 845-852.
- 16 **Martins M.I.M. & Justino R.C. 2007.** Efeitos de duas suplementações nutracêuticas sobre a qualidade do sêmen canino fresco. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35(1): 660-661.
- 17 **Michael A.J., Alexpoulos C., Pontiki E.A., Hadjipavlou-Litina D.J., Saratsis P., Ververidis H.N. & Boscós C.M. 2009.** Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 112(1): 119-135.
- 18 **Nery L.T.B. & Oliveira E.C.S. 2011.** Avaliação de um nutracêutico na eficiência reprodutiva de cães machos. In: *Anais do Congresso Med Vep de Especialidades Veterinárias*. (São Paulo, Brasil). p.232.
- 19 **National Research Council (NRC). 2006.** *Nutrient requirements of dogs and cats*. Washington: National Academy, 398p.
- 20 **Peña J., Nuñez-martinez I. & Moran J.M. 2006.** Semen Technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals*. 41(Suppl 2): 21-29.
- 21 **Poulos A., Darin-Bennet A. & Whitte I.G. 1973.** The phospholipid-bound fatty acid sandaldehydes of mammalian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 46(3): 541-549.
- 22 **Putarov T.C. 2010.** Avaliação de fontes de selênio e seus efeitos no perfil metabólico e condição reprodutiva de cães. 72f. Botucatu, SP. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- 23 **Silva A.R., Cardoso R.C.S., Uchoa D.C. & Silva L.D.M. 2003.** Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*. 59(3): 821-829.
- 24 **Surai P.F. 2002** Selenium. In: *Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction*. Nottingham: Nottingham University Press, p.233-304.
- 25 **Wang A. 1997.** Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*. 49(6): 921-925.
- 26 **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.
- 27 **Wu S.H., Oldfield J.E., Whanger P.D. & Weswig P.H. 1973.** Effect of selenium, Vitamin E and antioxidants on testicular function in rats. *Biology of Reproduction*. 8(5): 625-629.

