

## CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE CÃES DA RAÇA PASTOR ALEMÃO

### SEMINAL CHARACTERISTICS OF GERMAN SHEPHERD DOGS

José Adalmir Torres de SOUZA<sup>1</sup>; Walter SPICCIATI<sup>2</sup>; José Antônio VISINTIN<sup>2</sup>; Valquiria Hyppólito BARNABÉ<sup>3</sup>; Renato Campanarut BARNABÉ<sup>3</sup>

#### RESUMO

Sêmen de 25 cães da raça Pastor Alemão, com 1 a 7 anos de idade e pesando 30 a 35 quilos, foi coletado por masturbação. Com o objetivo de utilizar o material para inseminação artificial, colheu-se a segunda e parte da terceira fração, constatando-se, em média, volume de 7,17 ml; cor branca e aspecto leitoso; motilidade de 68,84%; vigor de 3,5; concentração de 136.192 espermatozoides por mm<sup>3</sup> e de 889.772.000 por ejaculado; defeitos espermáticos maiores de 9,92% e menores de 7,62%. O pH do sêmen, dos diluidores e do sêmen diluído variou, respectivamente, de 6,02 a 6,60; 5,85 a 6,90; e 5,97 a 6,76; a pressão osmótica de 285,20 a 295,00; 240,00 a 310,00; e 272,32 a 303,92 mOsmois e a concentração de sódio e potássio, respectivamente, para o plasma seminal e os 4 diluidores, de 134,40 a 156,00; 7,80 a 13,72; 3,00 a 270,00; e 6,00 a 25,00 mEq/l. Verificou-se que entre cães, houve variação significativa de todas as características seminais, exceto a pressão osmótica e, ainda, correlações entre os caracteres seminais e entre estes e os totais de patologias espermáticas. A variabilidade das características seminais entre os cães foi bem maior quando comparada entre as colheitas de cada animal, exceto a pressão osmótica e a concentração de sódio, que se apresentaram de maneira inversa.

**UNITERMOS:** Sêmen; Cães da raça Pastor Alemão

#### INTRODUÇÃO

Na espécie canina, o método da masturbação é preferível por permitir uma individualização das diferentes frações do ejaculado, propiciando ainda o estudo perfeito das características seminais<sup>1</sup>, evitando efeitos deletérios sobre os espermatozoides<sup>12</sup>.

As características seminais relacionadas ao volume, concentração, motilidade e pH têm sido estudadas na espécie canina<sup>9,11,15,17</sup> do mesmo modo que a determinação da porcentagem de formas espermáticas anormais<sup>3,10,16,18,19</sup>. Tais características foram ainda relacionadas com as estações do ano<sup>18</sup> e com a frequência das ejaculações<sup>19</sup>.

Alguns autores correlacionaram o volume do ejaculado ao peso vivo do animal<sup>6,13</sup>, enquanto outros verificaram uma relação inversa entre volume e concentração espermática<sup>10,23</sup>.

A influência do pH e da pressão osmótica sobre a motilidade espermática também foi investigada em diferentes diluidores específicos para cães<sup>7,8</sup>.

Por outro lado, características bioquímicas do sêmen foram estudadas<sup>2</sup>, verificando-se o efeito deletério de diluidores hipotônicos<sup>20</sup> e o aumento da motilidade espermática pelo potássio, magnésio e cálcio<sup>21</sup>, bem como a concentração de sódio e potássio nas três frações do ejaculado.

Na referência disponível sobre a raça Pastor Alemão<sup>14</sup>, foi investigado o número total de espermatozoides por ejaculado e a motilidade espermática, objetivando a prática de inseminação artificial com sêmen congelado.

Diante desta escassez, objetivou-se o estudo de características físicas, morfológicas e da concentração de sódio e potássio do sêmen de cães da raça Pastor Alemão, frente a quatro diluidores, para utilização em inseminação artificial.

#### MATERIAL E MÉTODO

Na pesquisa foram utilizados 25 cães da raça Pastor Alemão, com idade de 1 a 7 anos, pesando de 30 a 35 quilos e pertencentes ao Canil da Polícia Militar do Estado de São Paulo. Os animais, submetidos diariamente a exercícios de treina-

1 - Pós-graduando - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.  
2 - Professor Doutor - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.  
3 - Professor Titular - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

mento, recebem alimentação básica de carne cozida, arroz, cenoura e leite, tendo sido selecionados após exame clínico geral e específico do aparelho reprodutor e após adaptação ao método de masturbação para colheita de sêmen, foram individualmente catalogados.

As colheitas foram efetuadas pela manhã, antes dos exercícios diários e pelo menos 48 horas após coberturas. Cada animal forneceu 5 ejaculados, com intervalos de uma semana entre colheitas, sendo colhidas a segunda e parte da terceira fração em tubo de ensaio mantido em recipiente térmico<sup>3</sup>, verificando-se de imediato o volume, a cor e o aspecto do material seminal, a seguir colocado em banho-maria a 37°C, para posterior avaliação da motilidade em microscopia comum, com resultado expresso em porcentagem e o vigor da motilidade calculado em escala de 0 a 5.

O pH foi determinado em pHmetro\*, a pressão osmótica em osmômetro\*\* e a quantificação de sódio e potássio através de fotômetro de chama\*\*\*. A concentração de espermatozoides por mm<sup>3</sup> foi verificada pelo método hematimétrico, em câmara de Neubauer, servindo de base para o cálculo do número de células espermáticas no ejaculado.

A morfologia espermática foi estudada em lâminas coradas pelo método de Williams e em preparações úmidas em microscopia de interferência diferencial sob imersão e aumento de 1.250 vezes. A porcentagem de formas anormais foi estabelecida pela contagem de 200 células espermáticas, classificando as patologias em defeitos maiores e menores<sup>4</sup>.

Quatro diferentes diluidores, preparados 24 horas antes de iniciadas as colheitas, foram caracterizados quanto ao pH, à pressão osmótica (mOsmois) e à concentração de sódio e potássio (mEq/l).

D <sub>1</sub> Gema-citrato	
Solução de citrato de sódio a 2,94%	..... .80 ml
D <sub>2</sub> Gema-lactose	
Solução de lactose a 11%	..... .80 ml
D <sub>3</sub> Gema-leite desnatado	
Solução de leite em pó desnatado a 9%	..... .80 ml
D <sub>4</sub> TRIS-gema	
Frutose	..... .1.00 g

TRIS	..... .2,40 g
Ácido cítrico	..... .1,30 g
H <sub>2</sub> O	..... .72,20 ml

A cada um dos diluidores foram acrescentados 20 ml de gema de ovo, 1000 UI de penicilina/ml e 1000 µg de estreptomicina/ml.

Para descrição dos resultados foi utilizada a Análise de Variância para estimar a média populacional de cada variável, comparar a variabilidade entre colheitas de sêmen de um mesmo animal e estimar as correlações existentes entre as variáveis estudadas. Estimativas por Ponto das Médias e Comparações Múltiplas pelo Método de Tukey foram feitas para comparar os 4 diluidores relativamente à sua influência no pH e pressão osmótica do sêmen.

## RESULTADOS

As médias gerais, assim como os valores médios, mínimos e máximos de cada característica estudada no sêmen de cães da raça Pastor Alemão, podem ser observados na Tab. 1.

**TABELA 1**

Médias gerais e valores mínimos e máximos das médias de características seminais de 25 cães da raça Pastor Alemão, São Paulo, 1986.

Característica	Média	Valor mínimo	Valor máximo
Volume (ml)	7,17	2,70	13,80
Motilidade (%)	68,0	0,0	90,0
Vigor (0-5)	3,55	0,0	4,0
Concentração			
Espz/mm <sup>3</sup>	136.192	18.200	326.880
Espz/ejaculado (x 10 <sup>3</sup> )	885.772	59.150	1.689.424
pH	6,32	6,02	6,60
Pressão osmótica (mOsmois)	289,20	285,20	295,00
Sódio (mEq/l)	145,32	134,40	156,00
Potássio (mEq/l)	11,06	7,80	13,72

Espz = espermatozoides

\* = Radiometer BMS<sub>3</sub> MK<sub>5</sub> Blood Micro Cister  
 \*\* = FISKE OM<sup>tm</sup> OSMOMETER  
 \*\*\* = DMFC - 1 DIGIMED

A somatória das médias dos defeitos espermáticos maiores e menores apresentou valores mínimos, máximos e total geral representados na Tab. 2.

**TABELA 2**

Médias, valores mínimos e máximos (%) da somatória das médias dos defeitos maiores e menores em sêmen de cães da raça Pastor Alemão. São Paulo, 1986.

Total	Média	Valor mínimo	Valor máximo
Defeitos maiores	9,92	3,25	23,40
Defeitos menores	7,62	1,40	27,80
Geral	17,52	4,70	51,20

O pH, a pressão osmótica e a concentração de sódio e de potássio dos quatro diluidores estão mencionados na Tab. 3.

**TABELA 3**

pH, pressão osmótica (mOsmois) e concentração de sódio (mEq/l) e de potássio (mEq/l) dos quatro diluidores utilizados no experimento. São Paulo, 1986.

Características Diluidores	pH	P. osmótica	Sódio	Potássio
Gema-citrato	6,90	290	270	6,8
Gema-lactose	6,25	310	3	6,0
Gema-leite	6,40	240	10	25,0
TRIS-gema	5,85	300	4	6,0

mOsmois = miliosmois

mEq/l = milequivalente por litro

A Tab. 4 representa as correlações entre as características seminais de cães da raça Pastor Alemão.

**TABELA 4**

Correlação entre as características do sêmen de cães da raça Pastor Alemão. São Paulo, 1980.

Variáveis	Volume	Motilidade	Vigor	Concentração	pH	P.Osmótica	Na	K	Idade	Cabeça (dm)	P.Int. (dm)	Cauda (dm)	G.C.D. (dm)	Acrossomo (DM)	Cabeça (DM)	P.Int. (DM)	Cauda (DM)	G.C.P. (DM)	
Volume																			
Motilidade	.0482																		
Vigor	.0331	.8061																	
Concentração	-.3614	.3873	.4468																
pH	-.2531	.2339	-.1114	.0640															
P. Osmótica	-.1205	.0972	-.0361	.0184	.0922														
Na	.1262	.0460	-.0357	-.2748	-.2199	-.2861													
K	.0774	-.1890	-.2388	-.0502	-.1791	-.1069	-.1000												
Idade	.1578	-.4037	-.3931	-.5282	-.0526	-.0020	.2483	.0820											
Cabeça (dm)	.0098	-.2670	-.2736	-.2902	.3233	-.0551	-.1145	.3209	.4264										
P. Intermed. (dm)	-.0665	-.3932	-.1643	-.0515	.0850	-.1039	.1529	.0389	.0776	.2718									
Cauda (dm)	-.0978	-.5021	-.3884	-.0433	.2236	.0997	-.1707	-.0695	.2615	.4924	.1577								
G.C.D. (dm)	-.0303	-.5047	-.3143	-.0927	.1355	.0834	-.1351	.0469	.1958	.5497	.4140	.3188							
Acrossomo (dm)	.1162	-.2314	-.1107	-.1158	.0963	-.0590	-.0115	.1516	.1313	.1944	.2670	.0179	.1796						
Cabeça (DM)	-.0328	-.5408	-.6218	-.0893	.3145	.1403	-.0715	.2647	.2585	.7319	.2859	.3331	.3226	.0955					
P. Intermed. (DM)	.0301	-.4001	-.2683	-.1593	-.0802	.0093	-.0562	.0984	.1817	.2961	.3336	.2688	.4889	.2566	.1273				
Cauda (DM)	-.0374	-.5233	-.3623	-.2208	.1569	.1312	-.1633	-.0448	.1918	.4217	.2471	.6075	.4595	.0959	.1970	.3646			
G.C.P. (DM)	-.0098	-.6713	-.4590	-.114	.1578	-.0320	-.0361	.2093	.2240	.5819	.5098	.3353	.6050	.3162	.4151	.5141	.3605		

DM = defeitos maiores  
dm = defeitos menores

**REFERÊNCIA**

## DISCUSSÃO

Dentre os vários métodos de colheita de sêmen no cão, a masturbação tem-se mostrado bastante eficiente e segura<sup>1,12</sup>.

O ejaculado do cão compõe-se de 3 frações distintas<sup>2,5,10,18,19,22</sup>, sendo a primeira constituída de pequena quantidade de líquido claro e transparente, com ou sem espermatozoides e de aspecto aquoso; a segunda, de pouco líquido branco, rico em espermatozoides e de aspecto leitoso; e a terceira, de líquido claro ou transparente, praticamente desprovida de espermatozoides e de aspecto aquoso, representando o maior volume do ejaculado<sup>6,15</sup>. Não consideramos o ejaculado total ou em frações isoladas e sim, a segunda e parte da terceira fração<sup>9</sup>, de acordo com a cor esbranquiçada e o aspecto leitoso, que estão relacionados com a concentração espermática<sup>11</sup>, com o intuito de efetuar diluição e conservação desta porção rica em espermatozoides, e atender ao sentido prático da inseminação artificial<sup>14,17,20,21</sup>.

O volume da segunda e parte da terceira fração seminal variou, em média, de 2,70 a 13,80 ml (Tabela 1), tendo como média populacional 7,17 ml, não podendo, portanto, ser comparado com os resultados dos autores que trabalharam com o ejaculado total<sup>3,10,13,16,19,23</sup> e em 3 frações isoladamente<sup>5,6,11,15,18</sup>. Não obstante, os resultados são superiores àqueles que consideraram a porção rica em espermatozoides<sup>9,17</sup>.

Embora a motilidade progressiva retilínea não constitua, por si só, padrão de medida de vitalidade e poder de fecundação dos espermatozoides, ela é necessária para a fertilização, tornando-se, então, importante parâmetro para avaliação imediata do sêmen. A motilidade variou, em média, de 0,0 a 90,0% (Tab. 1), enquanto a média populacional foi de 68,8%, estando de acordo, tanto para os ejaculados totais quanto para os fracionados<sup>17,19</sup>, porém inferior a outros<sup>3,9,14,15,18</sup>.

Apesar de nenhum dos autores consultados ter classificado as patologias em defeitos maiores e menores, constatamos que o total de espermatozoides anormais (Tab. 2) encontrado é superior àqueles citações<sup>3,10,15,16,18,19</sup>.

A média de pH, 6,32, com variação de 6,02 a 6,60, está próxima às dos autores que consideraram o ejaculado fracionado<sup>17,22</sup>, onde podemos observar que a terceira fração ou fração prostática possui certa influência também no ejaculado total<sup>5,20</sup>. Já para o ejaculado total ocorre, ocasionalmente, semelhança<sup>15</sup> ou ligeira inferioridade<sup>11,16,23</sup>. Devemos salientar que o pH pode variar com a riqueza espermática, ou seja, o sêmen rico em espermatozoides apresenta pH ligeiramente ácido e, quando pobre, ligeiramente alcalino<sup>1,20</sup>, podendo ainda dar uma idéia da concentração espermática<sup>1</sup>.

O pH dos quatro diluidores e destes, quando acrescidos de sêmen, mostrou uma ligeira variação, sendo que os diluidores D<sub>1</sub> e D<sub>3</sub> mais o sêmen mostraram pH médio superior à média geral do sêmen puro. Já o sêmen diluído em D<sub>2</sub> e D<sub>4</sub> mostrou pH médio inferior. Pelas comparações múltiplas (dois a dois), verificou-se que os quatro diluidores agem diferentemente sobre o pH do sêmen. Na literatura encontra-se afirmação de que os espermatozoides possuem melhor sobrevivência em diluidores gema-tampão com pH 6,6<sup>7,8</sup>.

A pressão osmótica do sêmen apresentou média de 289,20 e limites de 285,20 a 295,00 mOsmois (Tab. 1), valores que não mostraram variação significativa entre os animais estudados, o mesmo não ocorrendo com os diluidores. Os diluidores D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>4</sub> e D<sub>3</sub>, quando acrescidos do sêmen, apresentaram pressão osmótica média respectivamente superior e inferior à média geral no sêmen puro. O efeito deletério sobre as células espermáticas, dos diluidores hipotônicos em comparação aos hipertônicos já foi salientado<sup>20</sup>, mesmo quando de composição similar. A tonicidade dos diluidores é considerada ótima quando o FPD (Freezing Point Depression) situa-se entre -52 a -66°C<sup>8</sup>, o que concorda com os resultados obtidos. Além disso, constatou-se que os espermatozoides toleram mais as variações de tonicidade no diluidor TRIS-gema do que no citratogema, embora a pressão osmótica medida pelo FPD seja mais alta no TRIS-gema<sup>7</sup>.

As concentrações médias de sódio e potássio no sêmen foram, respectivamente, 145,32 mEq/l (134,40 a 156,00) e 11,06 mEq/l (7,80 a 13,72) (Tab. 1). Considerando o ejaculado fracionado, os valores são concordantes com a literatura<sup>2,5,22</sup>.

A Tab. 3 mostra a concentração de sódio e potássio nos diferentes diluidores, gema-citrato 270,0 e 6,8; gema-lactose 3,0 e 6,0; gema-leite 10,0 e 25,0; e TRIS-gema 4,0 e 6,0 mEq/l. Já foi verificado que potássio, magnésio e cálcio, isoladamente nos diluidores, aumentam a motilidade dos espermatozoides, enquanto o efeito dos três combinados é menor do que potássio e magnésio ou potássio e cálcio juntos, salientando-se ainda que o excesso de potássio deprime a motilidade dos espermatozoides<sup>20,21</sup>.

Verificamos, ainda, que houve variações significantes entre cães para todas as características seminais estudadas, exceto no que se refere à pressão osmótica. Na Tab. 4 verificam-se as correlações entre as diferentes características seminais, observando-se forte correlação positiva entre a motilidade e o vigor, entre os defeitos individuais maiores e menores de cabeça, de cauda e gotas citoplasmáticas além de acentuada correlação negativa da motilidade e vigor com as anormalidades espermáticas individuais de cabeça e gota citoplasmática proximal.

## CONCLUSÕES

O estudo de algumas características físicas, morfológicas e bioquímicas do sêmen de cães da raça Pastor Alemão permite as seguintes conclusões:

1 - A variabilidade das características entre cães é bem maior em relação à variabilidade entre as colheitas de cada animal, exceto para a pressão osmótica e concentração de sódio que apresentam variabilidade maior entre as colheitas de um mesmo animal do que entre os diferentes cães.

2 - A motilidade apresenta boa correlação positiva com o vigor e, estes dois, uma correlação negativa com a patologia em geral.

3 - As amostras de sêmen diluídas em gema-citrato e gema-leite desnatado mostram médias de pH mais altas em relação à média geral observada no sêmen puro, enquanto as amostras diluídas em gema-lactose e TRIS-gema apresentam médias mais baixas; pelas comparações múltiplas (dois a dois), os quatro diferentes diluidores agem diferentemente sobre o pH.

4 - As amostras de sêmen diluídas em gema-citrato, gema-lactose e TRIS-gema apresentam médias de pressão osmótica mais altas em relação à média geral observada no sêmen puro, enquanto as amostras diluídas em gema-leite desnatado revelam média mais baixa; pelas comparações múltiplas (dois a dois), os diluidores gema-lactose e TRIS-gema agem de forma igual sobre a pressão osmótica.

## SUMMARY

Semen was collected by masturbation from 25 German Shepherd dogs, 1 to 7 years old and weight from 30 to 35 kg. Aiming to utilize the semen for artificial insemination, only the second and partial third fractions were used. Results were as follows: mean ejaculation volume 7.17 ml; white colour and milky aspect; sperm motility 68.84%; vigour 3.5; concentration 136.192 spermatozoa/mm<sup>3</sup> and 889.772.000 spermatozoa by ejaculation; 9.92% of major defects, 7.62% of minor defects and still an individual abnormalities classification. The pH of semen, of extenders and of extended semen, respectively, varied from 6.02 to 6.60; 5.85 to 6.90 and 5.97 to 6.76; osmotic pressure of 285.20 to 295.00; 240.00 to 310.00 and 272.32 to 303.92 mOsm and sodium and potassium concentrations, respectively, to seminal plasma and 4 extenders, 134.40 to 156.00 and 7.80 to 13.72 and 3.00 to 270.00 and 6.00 to 25.00 mEq/l. There was significant variation among dogs, in all seminal characteristics, except for osmotic pressure. There was also correlation between the seminal characteristics and between these and total sperm abnormalities. Variability of seminal characteristics among dogs is greater when comparing collections of each animal, with exception of osmotic pressure and sodium concentration variability that is reversed.

**UNITERMS:** Semen; German Shepherd dogs

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-ANTOINE, J. **Contribution à l'étude de l'insémination artificielle chez le chien**: étude systématique du sperme de chien. Alfort, 1952 (Thèse pour le doctorat). École Nationale Vétérinaire.
- 2-BARTLETT, D.J. Biochemical characteristics of dog semen. *Nature*, v.182, p.1605-6, 1958.
- 3-BICUDO, S.D. Estudo de algumas características do sêmen do cão. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5., *Anais*. Belo Horizonte, p.395-6, 1983.
- 4-BLOM, E. Ultrastrukturen af nogle karakteristiske spermiedefekter og forslag til et nyt klassificerings-system for tyrens spermogram. /The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram/. *Nordisk Veterinärmedicin*, v.25, p.383-91, 1973.
- 5-BRAOUDÉ, P. **Contribution à l'étude de l'insémination artificielle dans l'espèce canine**. Alfort, 1979 (Thèse pour le doctorat). École Nationale Vétérinaire.
- 6-DUBIEL, A. Studies in semen collection by masturbation method and on ejaculation reflex in dogs. *Weterynaria Wroclaw*, v.29, p. 225-34, 1972.
- 7-FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog semen. *American Journal of Veterinary Research*, v.25, p.37-40, 1964.
- 8-FOOTE, R.H.; LEONARD, E.P. The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of

dog sperm in buffered-yolk extenders. *Cornell Veterinarian*, v.54, p.78-88, 1964.

9-GILL, H.P.; KAUFMAN, C.F.; FOOTE, R.H.; KIRK, R.W. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *American Journal of Veterinary Research*, v.31, p.1807-13, 1970.

10-HANCOCK, J.L.; ROWLANDS, I.W. The fisiology of reproduction in the dog. *Veterinary Record*, v.47, p.771-9, 1949.

11-HARROP, A.E. Some observations on canine semen. *Veterinary Record*, v.67, p.494-9, 1955.

12-KIRK, R.W. Artificial insemination in the dog. *Allied Veterinarian*, v.30, p.40-4, 1959.

13-LAURANS, R.; WILCZYNSKA, H. Algunas observaciones sobre el volumen, la concentración y la conservación del espermatozoa normal de perro. *Revista de Fisiopatología e Reproducción Animal*, Madrid, v.2, p.73-6, 1949.

14-LEES, G.E.; CASTLEBERRY, M.W. The use of frozen semen for artificial insemination of German shepherd dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.13, p.382-6, 1977.

15-MIALOT, J.P. Examen de l'appareil genital du chien. *Point Vétérinaire*, v.10, p.65-72, 1980.

16-PÉREZ GARCIA, T.P. Aportaciones a los métodos de recogida y contrastación del espermatozoa de perro. *Revista del Patronato de Biología Animal*, v.3, p.97-138, 1957.

17-ROYCHOUDHURY, P.N.; DUBAY, M.L. Observations on dog semen. I. Dilution and conservation in three extenders. *Zootecnica e Veterinaria*, Milano, v.29, p.117-21, 1974.

18-TAHA, M.B.; NOAKES, D.E.; ALLEN, W.E. The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. *Journal Small Animal Practice*, v.22, p.177-84, 1981.

19-TAHA, M.B.; NOAKES, D.E.; ALLEN, W.E. The effect of the frequency of ejaculation on seminal characteristics and libido in the beagle dog. *Journal Small Animal Practice*, v.24, p.309-15, 1983.

20-WALES, R.G.; WHITE, I.G. The interaction of pH, tonicity and electrolyte concentration on the motility of dog spermatozoa. *Journal of Physiology*, London, v.141, p.273-80, 1958.

21-WALES, R.G.; WHITE, I.G. The effect of the ions of the alkali metals magnesium and calcium on dog spermatozoa. *Journal of Physiology*, London, v.142, p.494-502, 1958.

22-WALES, R.G.; WHITE, I.G. Some observations on the chemistry of dog semen. *Journal Reproduction and Fertility*, v.9, p.69-77, 1965.

23-WHITE, I.G. Biochemical aspects of mammalian semen. *Animal Breeding Abstracts*, v.26, p.109-23, 1958.

Recebido para publicação em 19/08/93  
Aprovado para publicação em 13/12/94