

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

LIDIANNE FABRÍCIA DOS SANTOS MARTINS

MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CANINO
(REVISÃO DE LITERATURA)

Uberlândia - MG

2018

LIDIANNE FABRÍCIA DOS SANTOS MARTINS

MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CANINO

(REVISÃO DE LITERATURA)

Monografia apresentada à
Faculdade de Medicina Veterinária
da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial à
aprovação na disciplina de Trabalho
de Conclusão de Curso 2.

Orientadora: Prof^a. Dra. Teresinha Inês de Assumpção

Uberlândia - MG

2018

RESUMO

Várias pesquisas buscam compreender a fisiologia reprodutiva da espécie canina e a fraca resposta do sêmen do cão às técnicas da congelação. Nos últimos anos, a Inseminação Artificial tem crescido na reprodução canina e têm sido realizadas inúmeras pesquisas sobre métodos que tragam menor prejuízo na qualidade dos espermatozoides criopreservados. A revisão de literatura teve por objetivo analisar os métodos de congelação de sêmen canino, os diluidores mais usados, visando um protocolo que traga menos prejuízos a qualidade do sêmen.

Palavras chave: cães, reprodução, congelação de sêmen.

ABSTRACT

Several researches seek to understand the reproductive physiology of the canine species and the weak response of the dog semen to the freezing techniques. In recent years, Artificial Insemination has grown in canine breeding and countless researches have been carried out on methods that bring about less impairment in the quality of cryopreserved spermatozoa. The literature review aimed to study canine semen freezing methods, the most used diluents and freezing methods, aiming at a protocol that brings less damage to the quality of the semen.

Key words: dogs, reproduction, semen freezing.

SUMÁRIO

1.	Introdução -----	1
2.	Revisão Bibliográfica -----	2
2.1.	Métodos de coleta de sêmen -----	2
2.1.1.	Fatores que influenciam a fertilidade do sêmen -----	2
2.1.2.	Avaliação espermática <i>in vitro</i> -----	2
2.1.3.	Motilidade espermática -----	3
2.1.4.	Morfologia espermática, integridade de membrana -----	3
2.2.	Crioprotetores -----	4
2.3.	Diluição do sêmen -----	4
2.3.1.	Meios diluidores para o congelamento de sêmen -----	5
2.3.2.	Água de coco -----	5
2.3.3.	Diluyente Tris -----	6
2.3.4.	Gema de ovo -----	7
2.4.	Centrifugação do sêmen -----	7
2.5.	Períodos de resfriamento do sêmen -----	8
2.6.	Métodos de congelação -----	8
2.7.	Descongelamento -----	9
2.8.	Espermatozoides epididimários em cães -----	10
3.	Considerações finais -----	10
	Referências bibliográficas -----	11

1. INTRODUÇÃO

O interesse no campo de reprodução de cães tem como razões: o melhoramento genético, a difusão de novas raças e um modelo experimental que poderá ser muito utilizado na preservação de canídeos silvestres.

Atualmente, a Inseminação Artificial (IA) que utiliza sêmen congelado, tem se tornado uma técnica reprodutiva muito utilizada por médicos veterinários que trabalham com melhoramento genético canino. O uso desse método traz vantagens como poupar os animais do estresse causado pelo transporte com objetivo de acasalamento, protegê-los do risco de possíveis doenças transmissíveis durante a cópula e preservação do material de alto valor genético.

A IA em cães é feita basicamente por duas técnicas: intravaginal e intrauterina. A IA por via intravaginal é feita depositando sêmen na vagina da cadela e a IA por via intrauterina, o sêmen é depositado diretamente no interior do útero (Silva et al., 2003).

A preservação de sêmen tem sido feita de duas formas: por meio de resfriamento (WITTAYARAT et al., 2012) e da congelação (FUTINO et al., 2010). Porém os resultados de fertilização com sêmen criopreservado são variados, fato que ocorre principalmente devido a perda de qualidade das células espermáticas após ser congelado-descongelado (SCHAFER-SOMI e AURICH, 2006).

Ainda não foi possível ter um padrão de congelamento de sêmen canino, por causa da variação individual e de raças. Devido a isso, existem vários protocolos elaborados, variando quanto ao meio de diluição, aos agentes crioprotetores e ao protocolo de congelamento (EILTS, 2005).

Objetivou-se com a presente revisão bibliográfica analisar os métodos de congelação de sêmen canino, os diluidores mais usados, os métodos de congelamento, visando um protocolo que traga menos prejuízos a qualidade do sêmen.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Métodos de coleta de sêmen

O método de coleta mais utilizado, segundo Kutzler (2005) é o de manipulação peniana, que pode ser feita na presença ou não da fêmea em estro, mas outros métodos alternativos, como a eletroejaculação e indução farmacológica da ejaculação, também são descritos.

O material mais utilizado para coleta por manipulação peniana é um tubo de ensaio unido a um funil de plástico, mas pode causar lesões traumáticas penianas durante a coleta, decorrentes dos movimentos pélvicos feito pelos animais (Johnston et al., 2001). No lugar dos funis plásticos, os cones de látex ou polipropileno, acoplados a tubos de ensaio permitem envolver o pênis do cão durante a coleta e evitar tal risco (JOHNSTON et al., 2001; KUTZLER, 2005).

É aconselhável coletar o sêmen uma vez a cada 48 horas, não sendo aconselhável realizá-la em períodos inferiores a este, ou realizar coletas diárias, por causa da redução da concentração espermática depois de 5 a 7 dias (ENGLAND e LOFSTEDT, 2000).

2.1.1. Fatores que influenciam a fertilidade do sêmen

Vários fatores influenciam no sucesso de congelamento, como por exemplo, os efeitos do processo sobre os espermatozoides, o efeito indireto da fêmea, o protocolo de inseminação escolhido, além das dificuldades encontradas no próprio método de congelamento, que são diretamente influenciadas pela variação existente entre cães de raças diferentes e entre indivíduos (CARDOSO et al., 2005; GRAHAM e MOCE, 2005).

2.1.2. Avaliação espermática in vitro

A escolha para qual método o sêmen será utilizado, inseminação artificial ou criopreservação, depende, entre outros fatores, de alguns parâmetros indicativos da qualidade do sêmen. A avaliação padrão do sêmen fresco é de acordo com seus parâmetros físicos e morfológicos. Entretanto, há evidências que esses parâmetros, isoladamente, não são suficientes para determinar um padrão de fertilidade de um ejaculado (CARDOSO et al., 2005).

Para isso, tem-se desenvolvido técnicas que podem ser baseadas ou não nos métodos que existem, que tornem as análises espermáticas mais precisas em relação a determinação da capacidade fertilizante do sêmen, direta ou indiretamente. Algumas análises são feitas, dentre elas estão a avaliação da motilidade e morfologia espermáticas, integridade da membrana plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial e funcionalidade da membrana espermática, teste de termorresistência e testes de interação entre gametas *in vitro* (NUNES, 2008).

2.1.3. Motilidade espermática

A definição de motilidade espermática é a porcentagem de espermatozoides totais ou progressivamente móveis, que pode ser analisada em microscópio de contraste de fase, ou pela análise computadorizada, que tem uma precisão sobre a proporção de células móveis e quantidade dos seus movimentos.

Mesmo a motilidade sendo apenas um dos parâmetros para a avaliação de um espermatozoide fértil, ela permanece como o primeiro indicador da função espermática (Neves, 2008). A motilidade é a manifestação do desempenho funcional do espermatozoide, diretamente correlacionada com a integridade de membrana e morfologia normal (PEÑA MARTÍNEZ, 2004).

Um dos métodos de avaliação é o CASA (*Computerized Assisted Sperm Analysis*), que tem sido muito utilizado na análise de sêmen fresco (RIGAU et al., 2001). A análise se baseia no desempenho individual do espermatozoide, como parâmetros de velocidade, de motilidade progressiva, motilidade total. O CASA também divide populações espermáticas de acordo com a categoria de seus movimentos, em rápidos, médios, lentos e espermatozoides estáticos (RIJSSELAERE et al., 2007).

2.1.4. Morfologia espermática, integridade de membrana

A avaliação da morfologia espermática quantifica a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais, sendo valores acima de 80% o ideal em um ejaculado. A análise pode ser feita por câmera úmida, verificada em microscopia de contraste de fase após a fixação do material em solução salina tamponada, ou utilizando esfregaços

corados com Rosa de Bengala, Wright, Giemsa ou eosina-negrosina (CARDOSO et al., 2005).

As técnicas para determinação da integridade das membranas plasmática e acrossomal do espermatozoide utilizam métodos que avaliam funções espermáticas específicas, como as sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) em combinação com o iodeto de propídio (IP) (NEVES, 2008). Logo após, vieram outras sondas fluorescentes, como o SYBR-14, em combinação com o IP, sendo o primeiro permeável à membrana plasmática, marcando DNA da célula, ela estando afetada ou não, sendo esta última identificada quando corada somente pelo SYBR-14 (GRAHAM E MOCÉ, 2005).

2.2. Crioprotetores

Para que haja proteção do espermatozoide durante o congelamento e o descongelamento, crioprotetores devem ser adicionados ao meio. A interação destas substâncias com a membrana celular proporciona uma estabilização da mesma e evita lesões aos espermatozoides, pois possuem um ponto de congelação muito menor que o da água, evitando o acúmulo, e formação de cristais de gelo intracelular (MASSIP, 1987). Apesar da ação benéfica dos crioprotetores não é garantida a sobrevivência de 100% das células, uma vez que estes possuem efeito tóxico sobre as mesmas, dependendo da concentração utilizada no meio diluidor. Alguns exemplos de crioprotetores: glicerol, propilenoglicol, propanodiol, dimetilsulfóxido, sendo que os mais utilizados em cães são o etilenoglicol e dimetilformamida.

2.3. Diluição do sêmen

Uma melhor escolha de diluição de uma amostra de sêmen faz com que ele possa ser congelado e armazenado por tempo indeterminado, permanecendo com potencial fecundante, quando reaquecido para ser utilizado em uma IA. Um bom diluente deve apresentar nutrientes como uma reserva de energia, e também servir como tampão, ajustando as alterações de pH (SILVA, 2005). Os diluidores são usados com o objetivo de proteger os espermatozoides dos efeitos críticos do processo de congelação mantendo

o potencial fertilizante das células espermáticas, que deverão, ao final de todo o processo, ter a vitalidade necessária para atingir o lugar da fertilização e estarem aptas para concluir a capacitação e reação acrossômica, que fazem com que seja possível a fecundação de um oócito (PEÑA, 2000).

A composição do meio diluidor é de extrema importância para a criopreservação do sêmen, e deve ser adequada de acordo com cada espécie. Os primeiros pesquisadores a investigar a combinação e a quantidade de vários componentes dos diluidores para preservação do sêmen de cão foram Foote (1964) e Foote e Leonard (1964).

Watson (2000) e Kirk (2001) classificaram os animais como “bons congeladores” e “maus congeladores”, e essas classes se diferem pela capacidade dos indivíduos em suportarem os efeitos deletérios da criopreservação.

2.3.1. Principais meios diluidores para o congelamento de sêmen

Vários meios diluidores têm sido testados e usados nos últimos anos, como diluidores à base de glicina-gema, leite desnatado, tampão tris e a base de água de coco (OLIVEIRA, 2003; CARDOSO, 2005). Existem também muitos diluidores comerciais, como o Triladyl, Laiciphos 478 e Biociphos W482 e CLONE, alguns deles desenvolvidos especialmente para o congelamento de sêmen canino. Entretanto, o que desfavorece esses diluidores é que sua exata composição é desconhecida (ACIPRESTE, 2006).

2.3.2. Água de coco

A água vinda do fruto do coqueiro do *Cocos Nucifera L* (membro da família *Palmae*) é uma solução estéril, ligeiramente ácida, rica em proteínas, sais e açúcares, vitaminas e fatores de crescimento e pobre em fosfolipídeo (BARBOSA, 2007). Nunes e Combarnous (1995) isolaram o ácido 3-indol-acético na água de coco, verificando que apresentava uma ação positiva sobre a motilidade de sêmen de ovinos e caprinos incubados a 37°C.

A água de coco na forma de pó (ACP®) foi usada como diluidor e obteve um bom resultado para inseminação artificial de sêmen fresco e resfriado de cão (UCHOA et al., 2007). No Brasil, há trabalhos em cães, mostrando que o meio diluidor à base de água

de coco oferece motilidade espermática de aproximadamente 50% após o congelamento (CARDOSO et al., 2000). Segundo Cardoso et al. (2003), que utilizou meios diluidores a base de água de coco com três concentrações diferentes de glicerol, não existe diferenças entre esses três grupos quanto a motilidade e vigor espermático. Mas, uma menor porcentagem de defeitos totais e secundários foram observados com o meio de água de coco e 6% de glicerol. Contudo, os autores garantiram que os três meios podem ser usados na criopreservação de sêmen canino.

2.3.3. Diluente Tris

Os primeiros experimentos para a preservação do sêmen canino por períodos curtos ou longos começaram com uma adaptação empírica de diluentes utilizados para o resfriamento e congelação do sêmen bovino com o uso de tampões à base de citrato (HARROP, 1962), leite desnatado (MARTIN, 1963); cloreto de fosfato (WALES e WHITE, 1963), Tris (FOOTE, 1964; GILL et al., 1970). Atualmente, a maioria dos grupos de pesquisa tem usado o diluente Tris, que tem se mostrado superior a outros diluentes (SILVA et al., 2000).

O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano – $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) é uma substância facilmente solúvel em água e disponível comercialmente com alto grau de pureza na forma de cristais. Atua como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (SILVA, 2005).

Silva et al. (2002) congelaram amostras de sêmen na ausência de glicerol ou gema de ovo, utilizando um diluente formado apenas por Tris-frutose-ácido cítrico e demonstraram que 11% dos espermatozoides foram capazes de apresentar motilidade depois da descongelação. O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico – $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) é outra substância que também entra na composição do diluente Tris, que nesse caso é utilizado na forma monohidratada (SILVA et al., 2002). É provável que o ácido cítrico auxilie na preservação da célula espermática, ajudando na manutenção do pH do diluente e atuando como antioxidante.

Varela Junior (2005) resfriando sêmen canino em meio Tris-glicose, contendo 6, 8 e 10% de lipoproteínas de baixa densidade, obteve melhores resultados na motilidade,

integridade da membrana e sobrevivência espermática a 5°C, quando comparado com o meio contendo 20% de gema de ovo.

Foi feito um experimento onde foi adicionado dodecil sulfato de sódio (SDS) em diluente Tris, mas os resultados apresentados mostram que a presença do SDS adicionado ao diluente Tris em concentrações de 0,1 e 0,2% não influencia na qualidade do sêmen de cão após a descongelação (COSTA et al., 2013).

2.3.4. Gema de ovo

A gema de ovo de galinha tem sido adicionada ao tampão Tris por proteger a membrana plasmática, restaurando os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico, decorrente da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento inicial do sêmen (SILVA, 2005). Além da sua ação de proteger a membrana plasmática, a gema de ovo também é conhecida por ser uma fonte proteica para o diluente (SANTOS, 2004).

Uma variedade de concentrações de gema de ovo tem sido utilizada para preservação de sêmen canino de acordo com a capacidade tamponante dos outros componentes do diluente, sendo que a concentração de gema mais utilizada é em torno de 20% do diluente (MARTINS, 2005). Moura (2000) comparou gemas de ovo de galinha e codorna como protetores de resfriamento na congelação de sêmen de cão e observou que não existem diferenças entre as mesmas, quanto à conservação da motilidade, vigor e morfologia espermática após a descongelação. Dessa forma, também pode-se utilizar ovo de codorna na congelação de sêmen canino. Além dos seus benefícios, a gema apresenta seus aspectos negativos, como a possibilidade de transmissão de doenças E também facilita o processo de oxidação sobre os espermatozoides caninos, permitindo peroxidação dos lipídios insaturados, à qual o espermatozoide canino é muito sensível (SILVA et al., 2002).

2.4. Centrifugação do sêmen

A centrifugação é uma das formas utilizadas para uniformizar variações (de volume e concentração espermática) sem que seja observado influência negativa sobre as células espermáticas (CUNHA, 2009). Também tem sido utilizada para eliminar a primeira e terceira frações de sêmen de cães (RIJSSELEARE et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006).

A análise dos efeitos do processo de centrifugação sobre o sêmen canino mostrou que a qualidade seminal das amostras de sêmen centrifugadas foi maior em relação às que não foram centrifugadas. (CUNHA e LOPES, 1999). Diversos autores (HELD, 1997; LOPES E PAPA, 1998; ROTA, 1998; STROM HOLST, 1999; PEÑA, 2000) tem descrito algumas metodologias de criopreservação do sêmen canino, usando a centrifugação, como uma maneira de eliminar plasma seminal e padronizar o volume do ejaculado. A associação da remoção do plasma seminal através da centrifugação com a adição de uma solução de centrifugação, com propriedades protetoras e ação tampão, pode ser uma alternativa para a eliminação do plasma seminal, que é deletério ao espermatozoide canino, prolongando a sobrevivência dos mesmos (CUNHA, 2002).

2.5. Períodos de refrigeração do sêmen

O resfriamento proporciona a célula espermática um estado de repouso, diminuindo o metabolismo e proporcionando uma diminuição nos gastos energéticos e na produção de catabólitos tóxicos. A interação dos componentes do meio diluidor com os espermatozoides contribui para diminuir os riscos de um choque térmico. As células espermáticas exigem um tempo de algumas horas para adquirirem resistência a baixas temperaturas antes de serem congeladas (ACIPRESTE, 2006), sendo recomendado um intervalo de uma a duas horas para a queda da temperatura de 37°C para 5 ou 4°C (YILDIZ et al., 2000; CUNHA e LOPES, 2001).

2.6 Métodos de congelação

O sêmen canino é congelado em vapor de nitrogênio líquido, por um minuto, se a palheta utilizada for de 0,5 ml, ou por trinta segundos, se a palheta for de 0,25ml; sendo armazenado em botijões de nitrogênio líquido, e verificado periodicamente (15 dias). Vários métodos têm sido descritos para a congelação do sêmen de cães e variam de acordo com o diluente e agentes crioprotetores empregados, com velocidades diferentes de congelação, com o objetivo de minimizar os efeitos negativos causados

pelo processo e recuperar o maior número possível de espermatozoides viáveis (STROM et al., 1997).

Andersen (1975) alcançou excelentes resultados quando utilizou a diluição do sêmen a 37°C em Tris acrescido de gema de ovo e glicerol. Na sequência, foi procedido um tempo de equilíbrio de três horas, seguido do envase em palhetas plásticas e a exposição aos vapores de nitrogênio para congelação. Atualmente esse método tem sido base em diversos trabalhos apenas com pequenas alterações.

SILVA et al. (2000) adaptaram a metodologia de congelação de sêmen de caprinos com diluente à base de água de coco para congelação do sêmen de cães com o diluente Tris. Os autores analisaram e perceberam que esse método é muito prático e rápido por não necessitar do tempo de equilíbrio após a adição de glicerol. Com o passar dos anos, foram realizados ajustes nessa metodologia, como a sugestão de uma concentração satisfatória de glicerol no diluente (SILVA et al., 2002) e da forma ideal para a adição do glicerol ao diluente (SILVA et al., 2003).

2.7 Descongelamento

Uma amostra de sêmen, quando descongelada, sofre ação da temperatura, que desempenha influência direta sobre a viabilidade espermática no pós-congelamento, provocando alterações no movimento espermático e na integridade das membranas (PEÑA, 2000).

Chirinéa (2004) e Martins (2005) utilizaram um método de descongelação a 75°C por 8s para o sêmen de cães e encontraram excelente qualidade espermática pós-descongelação. Segundo Nizański e Kuropka (2005) e Jurado et al. (2007), a alteração mais comum observada nos espermatozoides obtidos de cães e submetidos à descongelação é a falsa reação do acrossoma, que é dado por edema, vesiculação da membrana acrossomal externa e da membrana plasmática, assim como a perda total do acrossoma.

MOURA et al. (2013) avaliou o descongelamento do sêmen na temperatura de 37° C por um minuto e 70° C por 6 segundos e concluiu que altas temperaturas provocam mais danos espermáticos do que baixas temperaturas, sendo assim, a temperatura ideal para o descongelamento recomendada é de 37° C por um minuto.

2.8 Recuperação de espermatozoides epididimários em cães

A recuperação de espermatozoides caninos viáveis oriundos dos epidídimos é de extrema importância para a obtenção do material genético de machos de alto valor zootécnico (ANGRIMANI, 2013). O recurso de colheita tem vantagens, pois os espermatozoides podem ser obtidos após a morte do animal e destinados a protocolos de inseminação artificial a fresco ou congelação das amostras para posterior utilização (THOMASSEN e FARSTAD, 2009). A técnica também pode ser feita em animais inaptos à reprodução e portadores de afecções que comprometam seu sucesso reprodutivo (ANGRIMANI, 2013).

Hewitt et al. (2001) demonstraram que a conservação dos epidídimos de cães em temperatura ambiente e a recuperação dos espermatozoides duas horas pós-orquiectomia apresentaram características aceitáveis para a criopreservação, e as amostras permaneceram funcionalmente utilizáveis após a descongelação.

Existem várias técnicas descritas na literatura que relatam a coleta dos espermatozoides da cauda do epidídimo de diferentes espécies animais. No caso de cães, devido ao tamanho do epidídimo, os métodos de escolha podem ser: flutuação, fatiamento, lavagem e aspiração.

Os espermatozoides epididimários, em condições monitoradas de reprodução assistida, podem gerar resultados semelhantes comparados ao sêmen ejaculado, tendo sua utilização como alternativa para as biotecnologias da reprodução em cães (YU e LEIBO, 2002).

3. Considerações finais

A utilização de técnicas reprodutivas apresenta grande importância tanto para preservação, quanto para disseminação do material genético, possibilitando a

distribuição em escala mundial do sêmen dos cães reprodutores, além de evitar as doenças transmitidas através da cópula e o aproveitamento do sêmen de animais que possam estar impossibilitados de cobrir uma fêmea.

Há vários protocolos desenvolvidos com o intuito de encontrar uma melhor forma de criopreservar as células espermáticas dos cães com resultados semelhantes. Essas pesquisas têm sido feitas em cães domésticos e também em canídeos selvagens, com o intuito da preservação de espécies que correm risco de extinção.

Ainda é necessário o aperfeiçoamento dos estudos de biotecnologias reprodutivas em cães a fim de obter sucesso nos protocolos e nas diferentes raças.

Referências bibliográficas

ACIPRESTE, A. C. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando associações de crioprotetores e dois protocolos de descongelamento.** *Dissertação (Mestrado)*. Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 2006.

ANDERSEN, K. **Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique.** *Zuchtygiene*, v.10, p.1-4, 1975.

ANGRIMANI, D.S.R., LÚCIO, C.F., VEIGA, G.A.L., REGAZZI, F.M., SILVA, L.C.G., NICHI, M., VANNUCCHI, C.I. **Biotécnicas reprodutivas com o emprego de espermatozoides epididimários em cães.** *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.37, n.4, p.323-327. 2013

BARBOSA, C. C. **Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®): Efeito da temperatura de adição do glicerol e da adição de antibiótico.** *Dissertação (Mestrado)*. Fortaleza, Ceará, Brasil. 2007

CARDOSO, R. C. S., SILVA, A. R., UCHOA, D. C., SILVA, L. D. M. **Congelação do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol.** *Ciência Animal*, v.10, p.29-36. 2000.

CARDOSO, R. C. S., SILVA, A. R., UCHOA, D. C., SILVA, L. D. M. **Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations.** *Theriogenology*, v.59, p.743-751. 2003.

CARDOSO, R. C. S., SILVA, A. R., SILVA, L. D. M. **Métodos de avaliação do sêmen canino congelado.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.29, n.3/4, p.179-187. 2005.

CHIRINEA, V. H., SICHERLE, C. C., LOPES, M. D. **Congelamento de sêmen e sua eficiência na inseminação artificial de cães.** *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.164-168. 2013

CHIRINÉA, V. H. **Efeito do meio de congelação sobre as características morfo-funcionais do sêmen canino.** *Dissertação de Mestrado* – Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2004.

COLETO, Z. F. **Congelação do sêmen da espécie canina adicionado de anti-oxidantes.** *Tese (Doutorado)*. Recife, Pernambuco, Brasil. 2013.

COSTA, L. L. M., CASTELO, T. S., SOUZA, A. L. P., LIMA, G. L., SILVA, A. R. **Criopreservação de sêmen canino em diluente Tris adicionado de dodecil sulfato de sódio.** *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.53-58. 2013.

CUNHA, I. C. N. **Criopreservação do sêmen de cães.** *Tese (Doutorado)*. Botucatu, São Paulo, Brasil. 2002

CUNHA, I. C. N., LOPES, M. D. **Efeitos da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.23, n.3, p.306-307. 1999.

CUNHA, I. C. N., LOPES, M. D. **Efeitos da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.61, n.1, p.104-109. 2009.

CUNHA, I. C. N., LOPES, M. D. **Efeito de três diferentes diluidores sobre o sêmen canino submetido a dois protocolos de descongelamento.** *Braz J vet Res anim Sci*, São Paulo, v.42, n.5, p.372-380. 2005

CUNHA, I. C. N., LOPES, M. D. **Efeito do período de equilíbrio e meios diluidores sobre o sêmen canino congelado e descongelado.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.25, n.3, p.470-471. 2001.

EILTS, B. E. **Theoretical aspects of canine semen cryopreservation.** *Theriogenology*, v.64, n.3, p.692-697. 2005.

ENGLAND, G., LOFSTEDT, R. **Canine reproduction seminar.** USA: Atlantic veterinary College, p.64, 2000.

FOOTE, R.H. **Extenders for freezing dog semen.** *American Journal of Veterinary Research*, v.25, p.32-36. 1964.

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 Veterinary*, v.54, p.78-89. 1964.

FUTINO D. O., MENDES M. C. B., MATOS M. N. L., MONDADOR R. G., LUCCI C. M. **Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation.** *Reprod Domest Anim*, v.45, p.214-220. 2010.

GILL, H. P., KANFRAN, C. F., FOOTE, R. F., KIRK, R. W. **Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen.** *Am. J. Vet. Res.* v.31, p.1807-1813. 1970.

GRAHAM, J.K., MOCÉ, E. **Fertility evaluation of frozen/thawed semen.** *Theriogenology*, v.64, n.3, p.492-504. 2005.

HARROP, A. E. **Artificial insemination in the dog.** In: MAULE, P.T. (ed) *The Semen of Animals and Artificial Insemination.* Farnham Royal, UK: Commonwealth Agricultural Bureau. p.304-315. 1962.

HELD, J. P. **Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today's veterinary practice.** In: *CANINE MALE REPRODUCTION SYMPOSIUM*, 1997, Montreal. Anais... Montreal, 1997.

HEWITT D. A., LEAHY R., SHELDON I. M., ENGLAND G. C. W. **Cryopreservation of epididymal dog sperm.** *Anim Reprod Sci*, v.67, p.101-111. 2001.

JOHNSTON, S. D., KUSTRITZ, M. V. R., OLSON, P. N. S. **Canine and feline theriogenology.** Philadelphia: W.B. Saunders, p.569. 2001.

JURADO, S., SARMIENTO, P., STORNELLI, A. **Ultrastructural analysis of fresh and frozen-thawed dog spermatozoa.** Disponível em: <https://www.ciasem2005.cigb.edu.cu>. Acesso em: 23 de maio de 2018.

KIRK, E. S. **Flow cytometric evaluation of stallion sperm.** *Thesis (Master of Science)*, Fort Collins-CO. 2001

KUTZLER, M. A. **Semen collection in the dog.** *Theriogenology*, v.64, n.3, p.747-754. 2005.

LOPES, M. D., PAPA, F. O. **Effects of different diluents and method of centrifugation for canine semen congelation.** In: *CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION*, 23, 1998, Buenos Aires. Proceedings... Buenos Aires, 1998.

MARTIN, I. C. A. **The deep freezing of dog spermatozoa in diluents containing skim milk.** *Res. Vet. Sci.*, v.4, p.315 - 325. 1963.

MARTINS, M. I. M. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães.** *Tese (Doutorado)* – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2005.

MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; ECTORS, F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, v. 27, n. 1, p. 69-79, 1987.

MOURA, C. S. **Utilização de diferentes diluentes na criopreservação do sêmen de cão.** *Monografia (Graduação em Medicina Veterinária)* - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2000.

MOURA, C. S., NUNES, A. K. S., SILVA, B. S., PEIXOTO, C. A., SILVA, A. R., SILVA, S. V., GUERRA, M. M. P. **Efeito da temperatura de descongelação na integridade de espermatozoides criopreservados de cães.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.65, n.4, p.1057-1064. 2013.

NEVES, M. M. **Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de Gallus domesticus e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino.** *Tese (Doutorado)*. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 2008

NIŻAŃSKI, W., KUROPKA, P. **Ultrastructural changes in dog spermatozoa after freezing–thawing of semen extended in tris–based diluent supplemented with equex stm.** *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, v.8. 2005.

NÖTHLING, J. O., SHUTTLEWORTH, R. **The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen.** *Theriogenology*, v.63, p.1469-1480. 2005

NUNES, J. F., COMBARNOUS, Y. **Utilização da água de coco como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos.** *SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS*, 1, Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, p.53-63. 1995.

OLIVEIRA E. C. S. **Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino.** *Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)* - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

OLIVEIRA, E. C. S, JULIANI, G. C., HENRY, M. **Comparação entre os diluidores INRA82 e Tris associados aos crioprotetores glicerol e dimetilformamida na preservação de sêmen canino utilizando técnica de congelação computadorizada.** In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL*, Goiânia. Anais...Goiás: CBRA, 2005.

PEÑA MARTÍNEZ, A. I. **Canine fresh and cryopreserved semen evaluation.** *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.209-224. 2004.

PEÑA, A. I. **Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity.** *Tese (Doutorado)*. Uppsala. 2000.

RIGAU, T., FARRÉ, M., BALLESTER, J. et al. **Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates.** *Theriogenology*, v.56, n.5, p.801-815. 2001.

RIJSSELAERE T., MAES, D., HOFACK, G., KRUIF, A., SOOM, A.V. **Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by the Hamilton-Thorne Analyser.** *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, p.143–148. 2007.

RIJSSELAERE, T., VAN SOOM, A., MAES, D. et al **Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa.** *Theriogenology*, v.57, p.1669-1681. 2002.

ROTA, A. **Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa.** *Doctoral Thesis* - Acta Universitatis Agriculturae Sueciae Veterinaria. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Obstetrics and Gynaecology. 1998.

SANTOS, I. W. **Albumina sérica bovina como fonte protéica do diluidor Tris (hidroximetil amino metano) para congelação do sêmen canino.** *Tese de Doutorado* – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2004.

SCHAFER-SOMI S, AURICH C. **Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution.** *Anim Reprod Sci*, v.102, p.1-13. 2006.

SILVA, A. R., CARDOSO, R. C., UCHOA, D. C., SILVA, L. D. M. **Canine semen cryopreservation with different glycerol concentrations.** *Rev. Bras. Ci. Vet.*, v.9, p.25-28, 2002.

SILVA, A. R., CARDOSO, R. C. S., SILVA, L. D. M. **Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de coco.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v.30, n.6, p.1021-1025. 2000.

SILVA, A. R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos.** *Tese (Doutorado)*. Fortaleza, Ceará, Brasil. 2005.

SILVA, A. R., CARDOSO, R. C. S., UCHOA, D. C., SILVA, L. D. M. **Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing.** *The Vet. J.*, v.164, p.244-246, 2002.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C. et al. **Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process.** *Theriogenology*, v.59, p. 821-829. 2003.

SILVA, A. R., UCHOA, D. C., SILVA, L. D. M. **Uso da sonda de Osiris na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Rottweiler.** *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.5, p.147-149, 2002.

STROM HOLST, B. **In vitro characterisation of cryopreserved canine spermatozoa with special reference to post-thaw time and zona pelúcida binding capacity.** *Doctor's dissertation*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 1999.

STROM, B., ROTA, A., LINDE-FROSBERG, C. **"In vitro" characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation.** *Theriogenology*, v.48, p.247-256. 1997.

THOMASSEN R., FARSTAD W. **Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation.** *Theriogenology*, v.71, p.190-199. 2009.

UCHOA, D. C., SATIZINGER, S., AMARAL, M. C., SILVA, L. D. M. **O uso de diferentes diluidores para inseminação artificial com sêmen canino refrigerado.** *CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL*, 17, Belo Horizonte, CBRA, 2007.

VARELA JÚNIOR, A.S. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre a qualidade do sêmen canino submetido a criopreservação.** *Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)* – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2005.

WALES, R. G., WHITE, I. G. **Viability of diluted dog spermatozoa in vitro.** *J. Reprod. Fertil.*, v.5, p.67-76, 1963.

WATSON, P.F. **The causes of reduced fertility whith cryopreserved semen.** *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.481-492. 2000.

WITTAYARAT M., KIMURA T., KODAMA R., CHATDARONG K., TECHAKUMPHU M., SATO Y., TANIGUCHI M., OTOI T. **Long-term preservation of chilled canine semen using vitamin c in combination with green tea polyphenol.** *Cryo Lett*, v.33, p.318-326. 2012.

YILDIZ, C., KAYA, A., AKSOY, M. et al. **Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing.** *Theriogenology*, v.54, p.579-585. 2000.

YU I., LEIBO S. P. **Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4oC.** *Theriogenology*, v.57, p.1179-1190. 2002.