

Atualidades sobre o congelamento do sêmen canino:
fatores que influenciam sua fertilidade

Mariana Machado Neves

Doutora em Ciência Animal – Reprodução Animal

Professora adjunta do Departamento de Biologia Geral

Universidade Federal de Viçosa

e-mail: mariana.mneves@ufv.br

Apesar da primeira inseminação artificial ter sido realizada em cães, por Lazaro Spallanzani em 1788, esta não foi a espécie de escolha para o seu aprimoramento. Nos últimos 20 anos, os criadores de cães têm experimentado um inesperado interesse pela inseminação artificial e pelas técnicas de preservação de sêmen. O interesse pelo congelamento aumentou principalmente por dois motivos: o início do comércio internacional e o estabelecimento de bancos genéticos de reprodutores de alto valor zootécnico (De los Reyes, 2004; Peña et al., 2006).

Causas multifatoriais influenciam o sucesso do congelamento, como os efeitos do processo sobre os espermatozoides, o efeito indireto da fêmea, o protocolo de inseminação estabelecido, além das dificuldades existentes no próprio método de congelamento, que são altamente influenciáveis pela variação existente entre cães de diferentes raças e entre indivíduos (Cardoso et al., 2005; Graham e Moce, 2005).

O conhecimento das particularidades relacionadas à fisiologia reprodutiva do cão é importante para minimizar os efeitos do ejaculado sobre o congelamento. Características inerentes a ele, como a presença da próstata como única glândula sexual acessória e a liberação do ejaculado em frações, influenciam no protocolo de coleta e a qualidade do sêmen congelado, ao considerar que o plasma seminal atua negativamente sobre o espermatozoide durante o congelamento (England e Allen, 1992; Rota et al., 1995).

Aconselha-se coletar o sêmen uma vez a cada 48 horas, não sendo interessante realizá-la em períodos inferiores a este ou realizar coletas diárias, devido a redução da concentração espermática depois de cinco a sete dias (England e Lofstedt, 2000). Preconiza-se eliminar as frações prostáticas do sêmen que será congelado, sendo que alguns autores recomendam realizar esta separação no momento da coleta, através da obtenção apenas da segunda fração, ou coleta-se as frações juntas, sendo separadas posteriormente por meio de centrifugação (Peña, 1997; Oliveira, 2003; Okano et al., 2004).

Métodos de avaliação espermática *in vitro*

A decisão para qual finalidade servirá o sêmen, seja para inseminação artificial ou para criopreservação, irá depender, entre outros fatores, de certos parâmetros indicativos da qualidade do sêmen (Peña Martínez, 2004).

A avaliação padrão do sêmen fresco é, primariamente, baseada em parâmetros físicos. Contudo, há evidências de que tais parâmetros, isoladamente, não são suficientes para determinar um padrão de fertilidade de um ejaculado. Além disso, os indicadores de integridade física, rotineiramente utilizados na avaliação do sêmen, não são capazes de mensurar os complexos eventos físicos e bioquímicos que envolvem o processo de fertilização (Jeyendran et al., 1984; Cardoso et al., 2005).

Para isso, têm sido desenvolvidas técnicas, baseadas ou não nos métodos até então existentes, que tornem as análises espermáticas mais acuradas quanto a determinação da capacidade fertilizante do sêmen, direta ou indiretamente. Dentre as análises, são realizadas 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* (CBRA, 1998).

Alguns autores citam que o sêmen a ser congelado deve apresentar pelo menos 80% de espermatozoides móveis com movimento retilíneo, vigor igual ou acima de 4 e mínimo de 80% de espermatozoides com morfologia normal. Essas características espermáticas do ejaculado são importantes para viabilizar a obtenção, após o descongelamento, de pelo menos uma média de 50% de espermatozoides com motilidade progressiva, vigor ≥ 3 para realizar a inseminação artificial.

Pontos críticos no congelamento do sêmen canino

Um protocolo adequado de criopreservação de células espermáticas deve ser eficiente ao ponto de manter o potencial fertilizante das células que inclui, ao final de todo o processo, a manutenção da viabilidade para atingir o local da fertilização, a capacidade para concluir a capacitação e a reação acrossômica, que possibilitam a fecundação de um ovócito (Watson, 1995).

Para obter altos índices de viabilidade e fertilidade no sêmen congelado, é preciso estabelecer bem o protocolo de congelamento a ser seguido, conhecendo seus possíveis pontos críticos com o intuito de melhorar cada etapa de processamento, sempre embasado na literatura. Dentre estas, consideram-se as etapas de centrifugação, resfriamento e congelamento, descongelamento e os componentes do meio diluidor a ser utilizado.

Método de centrifugação

A centrifugação é o processo proposto na literatura para a padronização do volume e da concentração espermática dos ejaculados de cães. Este procedimento permite obter uma fração altamente concentrada em espermatozoides, além de eliminar o líquido prostático, que não contribui na preservação da viabilidade espermática durante o processo de congelamento (Amann e Pickett, 1987; Rota et al., 1995).

Vários autores têm utilizado a centrifugação nos protocolos de congelamento (Peña et al., 1998; Hermansson e Linde-Forsberg, 2002), apesar de terem sido detectados danos aos espermatozoides como redução da motilidade, lesão de membrana plasmática e alteração do *status* acrossomal, todos com potencial de reduzir a capacidade fecundante (Rijsselaere et al., 2002).

Para minimizar os efeitos da centrifugação, recomenda-se o uso de pré-diluidores, velocidade e tempo adequados, capazes de garantir boa proteção à célula espermática durante este processo. Diferentes velocidades e tempos são utilizados, variando de 300xg por cinco minutos (Santos et al., 2001) a 800xg por 15 minutos (Cunha e Lopes, 1999), sendo ideal um curto período de tempo com velocidade moderada, que permita a formação de sedimento sem causar lesões sérias aos espermatozoides (Rijsselaere et al., 2002). Cunha (2002), estudando o efeito da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino, observou que não houve alterações no movimento espermático e na integridade das membranas após centrifugação a 800xg por cinco minutos. Rijsselaere et al. (2002) recomendam a centrifugação a 720xg por cinco minutos, removendo, assim, o líquido prostático sem causar danos aos espermatozoides e com reduzida perda de células no sobrenadante.

Protocolo de resfriamento e congelamento

Para que o espermatozoide consiga adquirir resistência ao choque térmico, protocolos de congelamento têm sido desenvolvidos com o intuito de permitir melhor interação dos espermatozoides com os componentes do meio diluidor, variando de acordo com o tipo de meio, o crioprotetor utilizado e sua concentração (England, 1993; Watson, 1995; Bueno et al., 2001b; Thirumala et al., 2003).

Para o sêmen canino diluído, sugere-se um período de uma a duas horas para a queda da temperatura de 37°C a 4°C, seguida de um período de equilíbrio de uma ou duas horas (Silva e Verstegen, 1995; Oliveira, 2003). Olar et al. (1989) observaram que a taxa de congelamento moderada (5°C/min, de 5°C a -15°C e -20°C/min, de -15°C a -100°C) foi superior à rápida (-75°C/min) e à lenta (-2°C/min de 5°C a -15°C e -10°C/min, de -15°C a -100°C). Bouchard et al. (1990) verificaram que taxas de resfriamento menores que -0,3°C/min causam danos ao espermatozoide canino, enquanto que Hay et al. (1997) sugeriram uma taxa ótima de congelamento de -30°C/min.

Essas curvas de congelamento sempre foram realizadas expondo o sêmen ao vapor de nitrogênio, em caixa de isopor, e depois o imergindo no nitrogênio líquido e o estocando em botijão de nitrogênio. Porém, a altura das palhetas e o tempo de exposição ao vapor de nitrogênio variam entre protocolos, sendo que o tempo ótimo de congelamento ainda não foi estabelecido (Rota et al. 1997; Nöthling e Shuttleworth, 2005; Hori et al., 2006).

Atualmente, outros métodos de congelamento e armazenamento têm sido testados (Eilts, 2005). O uso de máquinas de congelamento tem obtido resultados melhores que aqueles congelados em caixas de isopor (Oliveira, 2003; Schäfer-Somi et al., 2006). Recentemente, foi descoberto que espermatozoides caninos podem ser congelados depois de 2-3 dias de estocagem a 4°C, sem diminuição significativa da qualidade espermática, quando comparado com o sêmen congelado imediatamente depois da coleta (Hermansson e Linde-Forsberg, 2002). Álamo et al. (2005), comparando o congelamento e estocagem do sêmen canino em nitrogênio líquido e em freezer de ultra-baixa temperatura (-152°C) por quatro meses, obtiveram bons resultados com esta nova técnica.

Temperatura de descongelamento

Freqüentemente, esquece-se de que o descongelamento influencia a taxa de sobrevivência, pois as células sofrem novamente modificações no seu volume e formações de cristais de gelo maiores, causando a ruptura celular. Isto vai depender da velocidade de congelamento, que está relacionada com a taxa de descongelamento. Células congeladas rapidamente podem conter pequenos cristais de gelo que, se o descongelamento for realizado também rapidamente, geralmente não implica em morte celular. Porém, se o descongelamento for muito lento, pode ocorrer a reorganização dos cristais de gelo, aumentando seu tamanho e lesionando as células. Por isso, estipulou-se que a velocidade de congelamento e descongelamento deve ser a mesma (Holt, 2000a; Eilts, 2005; Peña et al., 2006).

Pesquisadores adotam várias temperaturas de descongelamento em seus protocolos de congelamento do sêmen canino. O descongelamento rápido, 70 a 75°C por seis a oito segundos ou 55°C por 30 segundos, foi citado por Rota et al. (1998) e Hermansson e Linde-Forsberg (2002). Peña Martínez (2000) considera que a temperatura de 70°C por oito segundos melhorou os resultados de fertilidade para o sêmen canino. Em seu experimento, a autora sugere que o descongelamento a 37°C por 15 segundos pode expor as membranas espermáticas a variações de temperatura que induzem à reorganização de lípides ou a movimentação de proteínas, quando comparado com 70°C por oito segundos. Já o descongelamento lento, de 37°C por 15 a 60 segundos, foi utilizado por Penã e Linde-Forsberg (2000a), Yildiz et al. (2000), Bueno et al. (2001a) e Oliveira (2003). Temperaturas superiores a 80°C não incrementam a motilidade de

espermatozóides caninos após o descongelamento, quando comparada à temperatura de 70°C (Nöthling et al., 2007).

Componentes do meio diluidor para congelamento

Os meios diluidores utilizados na criopreservação de células devem conter nutrientes para o metabolismo espermático, servir como tampão para ajuste das alterações do pH, promover pressão osmótica e concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos, além de prevenir o crescimento bacteriano (Concannon e Battista, 1989).

Vários diluidores têm sido utilizados no congelamento do sêmen canino, contendo, geralmente, glicose ou frutose. Estes funcionam como reserva energética e substituem eletrólitos, mantendo o equilíbrio osmótico do diluidor (Peña et al., 1999; Yildiz et al., 2000; Bueno et al., 2001a; Stornelli et al., 2002). Rigau et al. (2001) citam que espermatozóides caninos incubados em meio contendo frutose apresentam um padrão de motilidade mais rápido e linear quando comparados àqueles incubados em meio com glicose. Porém, estudos têm mostrado que dissacarídeos, como a lactose, apresentam maior eficácia na preservação da integridade estrutural e funcional da membrana criopreservada, quando comparados com monossacarídeos (Chirinéa et al., 2003). Oliveira et al. (2003), comparando diluidores a base de Tris-gema e Lactose-gema com 5% de etileno glicol, verificaram ação superior do meio contendo lactose na criopreservação de espermatozóides caninos.

O meio básico INRA 82, modificado por Palmer (1984) tem sido utilizado em eqüinos, obtendo-se resultados satisfatórios na preservação de células espermáticas resfriadas e congeladas (Vidament et al., 2001; Rota et al., 2004). Em cães, Oliveira et al. (2005) encontraram bons resultados utilizando o INRA 82 no congelamento do sêmen canino em máquina de congelamento programada.

Um agente crioprotetor deve possuir baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade, sendo essencial para a sobrevivência das células espermáticas durante o processo de congelamento. Efeitos indesejáveis dependem da concentração utilizada e do período de exposição da célula ao mesmo, podendo causar perda da viabilidade espermática de mais de 50% ao descongelamento (Oliveira, 2003).

No início, os crioprotetores permeantes aumentam a hipertonicidade do meio extracelular, causando o efluxo de água e um encolhimento das células espermáticas. Porém, a célula logo volta ao seu tamanho normal, devido a passagem dos crioprotetores para o interior da célula, equilibrando osmoticamente o ambiente. Em temperaturas abaixo do ponto de congelamento, ocorre nova saída de água com formação de cristais de gelo extracelular, causando aumento da concentração de solutos no local. A água intracelular se torna super resfriada e um novo ambiente osmótico é estabelecido, resultando em nova perda de água pelo espermatozóide. Dependendo da

velocidade de congelamento, cristais de gelo podem ser formados dentro da célula, causando lesões de membrana (Gilmore et al., 1998; Watson, 2000; Eilts, 2005).

Crioprotetores permeantes atuam por meio de suas propriedades coligativas, diminuindo o ponto crioscópico intracelular. Dentre eles, o glicerol está presente na maioria dos protocolos de congelamento de sêmen canino, em concentrações que variam entre 2 a 8% (Peña et al., 1998; Rota et al., 1998). Este álcool polihídrico é altamente permeável, porém apresenta efeito deletério sobre a fertilidade do sêmen, o que estimula o estudo de crioprotetores alternativos (Watson, 1995; Medeiros et al., 2002; Rota et al., 2006).

O etileno glicol é um diálcool orgânico, líquido à temperatura ambiente, não volátil e incolor. É completamente miscível em água e é classificado como crioprotetor permeante, com peso molecular inferior ao do glicerol. Ele tem se mostrado uma ótima alternativa no tratamento de embriões de mamíferos e em espermatozóides caninos. Devido ao seu alto coeficiente de solubilidade, os danos causados pela desidratação e rehidratação durante o processo de congelamento e descongelamento são amenizados (Vannucchi et al., 1999; Baudot e Odagescu, 2004).

Os componentes do grupo amida, tais como formamida, acetamida e lactamida, também têm sido testados em diferentes espécies, obtendo-se bons resultados. Hanada e Nagase (1980), estudando o efeito das amidas no congelamento do sêmen de coelhos, verificaram motilidade pós-descongelamento maior em amostras que continham acetamida ou lactamida. Snoeck (2003) obteve bons resultados ao congelar sêmen equino utilizando acetamida associada a trealose e metilcelulose, similares aos encontrados para glicerol ou etileno glicol. Medeiros et al. (2002), ao testar o efeito das amidas na criopreservação do sêmen equino, verificaram que a adição do grupo *metil* às moléculas de acetamida e formamida melhorou o efeito crioprotetor das mesmas. Squires et al. (2004) verificaram que a metil formamida e a dimetil formamida protegeram melhor espermatozóides eqüinos congelados, quando comparados com acetamida ou formamida. Oliveira et al. (2003) verificaram que dimetil formamida a 5% protegeu satisfatoriamente as células espermáticas caninas submetidas ao congelamento. No entanto, o uso deste crioprotetor para a célula espermática canina ainda é muito restrito, necessitando-se de maiores estudos para estabelecer o real potencial crioprotetor desta base molecular.

A gema do ovo de galinha tem sido utilizada no congelamento de sêmen dos mamíferos por ser capaz de proteger as células espermáticas do choque térmico. Para o congelamento do sêmen canino, vários autores relataram que a concentração de 20% de gema no meio apresentou melhores resultados pós-descongelamento, quando comparado a 10% (Rota et al., 1997; Silva et al., 2000). Ecot et al. (2000) relataram que a concentração ideal da gema de ovo dependeria do crioprotetor permeante utilizado e das concentrações do mesmo.

Inseminação artificial x Sêmen Congelado

Na cadela, a inseminação artificial pode ser intravaginal ou intra-uterina, com deposição de sêmen fresco, resfriado ou congelado. A inseminação intravaginal é a mais comumente realizada, por ser de fácil execução quando comparada com a inseminação intra-uterina. Porém, para o sêmen congelado, estudos vêm demonstrando que, devido sua baixa viabilidade pós-descongelamento, sua deposição deve ser, obrigatoriamente, por via intra-uterina. Esta permite o alcance de altas taxas de prenhez (Johnston et al., 2001). A inseminação intra-uterina pode ser feita por laparotomia ou laparoscopia, existindo ainda a via intratubárica por laparotomia (Silva e Verstegen, 1995; Malm et al., 2000; Linde-Forsberg, 2001; Silva et al., 2003). No entanto, cada uma dessas vias apresenta vantagens e desvantagens.

Embora a fertilidade da espécie canina seja geralmente alta, com taxa de prenhez de mais de 90% na monta natural, a utilização de sêmen congelado pode mostrar resultados variáveis. Estes resultados são consequência da influência de alguns fatores, como local de deposição do sêmen, momento da inseminação, qualidade do sêmen, dose inseminante e frequência de inseminação (Silva e Verstegen, 1995). Taxas de prenhez de 84%, resultado de 327 inseminações com sêmen descongelado (Linde-Forsberg et al., 1999) e 71% em outras 312 inseminações (Thomassen et al., 2001), também com sêmen congelado, foram obtidas quando houve deposição seminal por via intra-uterina usando catéter Escandinavo. Em 10 anos de estudos considerando 286 inseminações com sêmen congelado de qualidade variável, processados em diferentes locais no mundo todo, e com grande variação na fertilidade, estes mostraram que a taxa de prenhez por inseminação artificial intravaginal foi de 35% quando comparada a 52% por via intra-uterina (Linde-Forsberg, 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLAMO, D.; BATISTA, M.; GONZÁLEZ, F. et al. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*, v. 63, p. 73-82, 2005.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, v. 7, n. 3, p. 145-174, 1987.

BAUDOT, A.; ODAGESCU, V. Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions. *Cryobiology*, v. 48, p. 283-294, 2004.

BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D. et al. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*, v. 34, n. 1, p. 147-157, 1990.

BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. et al. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. I – Efeito do meio diluidor. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 3, p. 364-371, 2001a.

BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. et al. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. II – Efeito do protocolo de resfriamento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 3, p. 372-379, 2001b.

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.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F. et al. Efeito da suplementação de diferentes açúcares no meio de congelamento de sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, n. 3, p. 361-363, 2003.

CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK. *Current Veterinary Therapy-small animal practice*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1989. p. 1247-1259.

CUNHA, I.C.N. *Criopreservação do sêmen de cães*. 2002. 144f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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. 306-308, 1999.

DE LOS REYES, M. Congelación de semen. In: GOBELLO, C. (Ed). *Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos*. Buenos Aires: Latina, 2004. p. 17-26.

ECOT, P.; VIDAMENT, M.; de MORNAC, A. et al. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 56, p. 141-150, 2000. Suppl.

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

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 47, p. 243-255, 1993. Suppl.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, v. 37, n. 2, p. 373-381, 1992.

GILMORE, J.A.; LIU, J.; PETER, A.T. et al. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 28-36, 1998.

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

HANADA, A.; NAGASE, H. Cryopreservation effects of some amides on rabbit spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 60, n. 1, p. 247-252, 1980.

HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J. et al. Canine spermatozoa - cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, v. 48, n. 8, p. 1329-1342, 1997.

HERMANSSON, U.; LINDE-FORSBERG, C. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. In: EUROPEAN VETERINARY SOCIETY FOR SMALL ANIMAL REPRODUCTION, 3, 2002, Liège. *Proceedings...* Bélgica: L'Université de Liège, 2002. p. 107-108.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v. 53, n. 1, p. 47-58, 2000a.

HORI, T.; ODAKA, S.; OBA, H. et al. Effects of liquid nitrogen vapor sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa. *Journal of Veterinary Medicine and Science*, v. 68, n. 10, p. 1055-1061, 2006.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEM, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 47, n. 1, p. 219-228, 1984.

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

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, v. 39, n. 6, p. 1279-1289, 1993.

MALM, C.; ROCHA, P.R.S.; GHELLER, V.A.; VALLER, G.R.; LAMOUNIER, A.R.; MARTINS, C. Inseminação intra-uterina pela técnica videolaparoscópica na cadela. In: IV Congresso Brasileiro e Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 2000, Goiânia. *Anais do IV Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária*. 2000, p. 162-162.

LINDE-FORSBERG, C. STRÖM, H.B., GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*, 52, p. 11-23, 1999.

LINDE-FORSBERG, C. Intra-uterine insemination in the dog using the scandinavian transcervical catheter and a comparison with other methods. In: *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca.NY, 2001. Disponível em: www.ivis.org. Acessado em: 02/05/2006.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v. 57, n. 2, p. 327-344, 2002.

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.

NÖTHLING, J.O.; DOLIESLAGER, S.M.J.; FILLEKES, R. et al. Thawing dog spermatozoa in just-boiled water: Submersion time and effect on sperm quality compared to thawing in water at 70°C. *Theriogenology*, v. 68, p. 530-537, 2007.

OLAR, T.T.; BOWEN, R.A.; PICKETT, B.W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, v. 31, n. 2, p. 451-461, 1989.

OLIVEIRA, E.C.S; JULIANI, G.C.; HENRY, M. et al. Viabilidade *in vitro* do sêmen canino submetido a congelamento com diferentes diluidores e crioprotetores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, n. 3, p. 363-365, 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 congelamento computadorizada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. *Anais...*Goiás: CBRA, 2005. p. 1.

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: *Proceedings of the 10 International Congress on Animal Reproduction Artificial Insemination*, v. 3, p. 377-378, 1984. Abstract.

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v. 54, p. 859-875, 2000.

PEÑA, A.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, v. 52, n. 6, p. 965-980, 1999.

- PEÑA, A.I. *Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelacion-descongelacion*. 1997. 310f. Tese (Doutorado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo.
- PEÑA, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A. et al. Effect of different glycerol, treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, v. 50, n. 1, p. 163-174, 1998.
- PEÑA, F.J.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J.M. Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, p. 21-29, 2006. suppl.2.
- PEÑA MARTÍNEZ, 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*. 2000. 45f. Tese (Doutorado) - Universidade de Ciências Agrônomas da Suécia, Uppsala.
- PEÑA MARTÍNEZ, A.I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 209-224, 2004.
- 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.; VAN SOOM, A.; MAES, D. et al. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 57, n. 6, p. 1669-1681, 2002.
- RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; TANGHE, S. et al. New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*, v. 64, p. 706-719, 2005.
- ROTA, A.; STROM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, v. 44, n. 6, p. 885-900, 1995.
- ROTA, A.; STROM, B.; LINDE-FORSBERG, C. et al. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*, v. 47, n. 5, p. 1093-1101, 1997.
- ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.; VANNOZZI, J. et al. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/ thawing rates. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 33, n. 5, p. 355-361, 1998.
- ROTA, A.; FURZI, C.; PANZANI, D. et al. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 39, p. 103-109, 2004.

ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G. et al. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, v. 65, p. 1848-1858, 2006.

SANTOS, S.E.C.; VANNUCCHI, C.I.; SATZINGER, S. et al. Comparação de dois crioprotetores na congelação de sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 25, n. 3, p. 472-473, 2001.

SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E. et al. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, v. 66, p. 173-182, 2006.

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*, v. 30, n. 6, p. 1021-1025, 2000.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*, v. 98, n. 546, p. 53-60, 2003.

SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v. 44, p. 571-579, 1995.

SNOECK, P.P.N. *Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade*. 2003. 112f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 62, p. 1056-1065, 2004.

STORNELLI, M.A.; STORNELLI, M.C.; ARAUZ, M.S. et al. Comparison of different concentrations of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. In: EUROPEAN VETERINARY SOCIETY FOR SMALL ANIMAL REPRODUCTION, 3, 2002, Liège. *Proceedings...* Bélgica: L'Université de Liège, 2002. p. 174-175.

THIRUMALA, S.; FERRER, M.S.; AL-JARRAH, A. et al. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiology*, v. 47, p. 109-124, 2003.

THOMASSEN R.; FARSTAD, W.; KROGENAES, A.; FOUIGNER, J.A.; ANDERSEN, B.K. Artificial insemination with frozen semen in the dog. A retrospective study. *J. Reprod. Fertil Suppl*, v. 57, p. 341-346, 2001.

VANNUCCHI, C.I.; SANTOS, S.E.C.; VISINTIN, J.A. In vitro viability of canine spermatozoa frozen in tris-fructose-citric acid extender with ethylene glycol. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 36, n. 4, p. 205-211, 1999.

VIDAMENT, M.; YVON, J.M.; COUTY, I. et al. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n. 3-4, p. 201-218, 2001.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction and fertility developmental*, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

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