

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MONOGRAFIA

Avaliação das características do sêmen resfriado de cães das raças Husky Siberiano e Chow Chow criados no semiárido paraibano com a utilização de três diferentes diluidores.

Lilianne Marinho dos Santos Azerêdo

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MONOGRAFIA

Avaliação das características do sêmen resfriado de cães das raças Husky Siberiano e Chow Chow criados no semiárido paraibano com a utilização de três diferentes diluidores.

Lilianne Marinho dos Santos Azerêdo
Graduanda

Prof^a. Dr^a. Norma Lúcia de Souza Araújo
Orientadora

Patos
Maio de 2013

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CSTR / UFCG - CAMPUS DE PATOS – PB de acordo com a AACR2
Biblioteca Setorial - CSTR/UFCG – Campos de Patos - PB

A993a
2013

Azerêdo, Lilianne Marinho dos Santos

Avaliação das características do sêmen resfriado de cães das raças Husky Siberiano e Chow Chow criados no semiárido paraibano com a utilização de três diferentes diluidores / Lilianne Marinho dos Santos Azerêdo. - Patos: CSTR/PPGMV, 2013.

38 f.: Il.

Inclui bibliografia.

Orientadora: Norma Lúcia de Souza Araújo

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Reprodução Animal. 2 – Sêmen 3 –Exame Andrológico. 4 – Teste Hiposmótico. I – Título.

CDU: 636.082.4:619

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

LILIANNE MARINHO DOS SANTOS AZERÊDO
Graduanda

Monografia submetida ao curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médica Veterinária.

APROVADO EM:/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

_____ Prof ^a . Dr ^a . Norma Lúcia de Souza Araújo	_____ Nota
_____ Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro	_____ Nota
_____ Prof ^a . Dr ^a . Melânia Loureiro Marinho	_____ Nota

*“Quando a gente acha que tem
todas as respostas, vem a vida e muda
todas as perguntas”.*

Luiz Fernando Veríssimo

DEDICO

Aos meus Bisavós, Aauto (In memoriam) e Almerinda (In memoriam), e à minha Avó Antônia Marinho (In memoriam) pelo carinho recebido. Saudades eternas.

Aos meus pais Manoel Messias e Euchélia Marinho, que eu amo tanto e que são as pessoas responsáveis por tudo que sou hoje. Esta conquista não é só minha, mas de vocês também.

Ao meu esposo Gerson Azerêdo, pelo amor dedicado, companheirismo e paciência e por ser uma pessoa tão especial e presente na minha vida.

Aos meus irmãos Júnior, Leonardo e Danielle, ao sobrinho Tony, a Dudu e Josilene e demais Familiares por todo o apoio durante o curso.

E ao meu amado amigo de quatro patas, Apollo, pelo carinho incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua divina providência e sua infinita compaixão. Por me dar saúde e força para permitir que pudesse realizar o sonho de ser Médica Veterinária.

A Nossa Senhora, pela sua maternal intercessão junto ao seu filho, nosso Senhor Jesus Cristo.

À minha orientadora Prof^a Dr^a **Norma Lúcia de Souza Araújo** não só por toda a paciência comigo durante a execução deste trabalho, mas também por acreditar em mim, pelos conselhos e amizade. Admiração e gratidão durante toda a vida!

Aos proprietários de Aruk, Bruce, Nick, Myck, Jack e Red, por terem disponibilizado os cães e por aceitar toda a equipe de braços abertos.

Ao Professor **George Beltrão** da UFPB Campus III, por ter executado a estatística do trabalho. Se não fosse pela sua ajuda não iria defender esse TCC nem tão cedo!

Aos professores **Carlos Peña** e **Melânia Loureiro**, pela participação na avaliação da monografia e por sempre estarem dispostos a compartilhar seus conhecimentos.

Aos colegas, funcionários e docentes do Laboratório de Reprodução Animal da UFCG, Campus de Patos-PB: **Verinha, Arthur Pombo, Artur George, Assis, Lindemberg** e Prof Dr **Carlos Peña**, pelo auxílio durante a execução deste trabalho. Às minhas amigas **Raizza e Suzanna** que toparam me ajudar nas colheitas e a todos que me ajudaram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

A todos os Professores em especial **Pedro Isidro, Gildenor Xavier e Francisco Nogueira**, pelo conhecimento compartilhado e por servirem de referência para minha formação profissional.

Às amigadas de longa data: **Andréia Alves, Andreza Alves, Liliane Oliveira**. Aos amigos que fiz durante o curso de Zootecnia, **Damiana, Elaine, Grayce Alves, João Paulo, Nélio, Rafaela Beltrão, Sérgio, Tamires Magalhães**.

Agradeço a amizade e o companheirismo de meus colegas de curso que se fizeram e se farão presentes por toda a minha vida, em especial **Christiano, Diego, Gabriela, Gustavo, Hugo, José Jackson, Karla Pollyanna, Larissa, Luma, Maira, Piêtro, Raizza, Raiara e Suzanna**, pelo incentivo nessa árdua caminhada em busca

da realização desse sonho de ser Médica Veterinária, pelos momentos de estudos, farras e descontrações. Todos vocês, deixarão saudade!

A todos os amigos e colegas que fiz durante o curso na UFCG, em especial **Ana Lucélia, Fabíola, Jefferson, Lilian, Lislely, Marie, Renato, Vanessa.**

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste sonho, que ajudaram-me a transpor mais esse degrau de minha vida e que vocês se mostrem presentes e continuem a auxiliar-me na minha carreira profissional.

E por fim, agradeço aos Animais por tudo o que são e representam.

MEU MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

AZERÊDO, LILIANNE MARINHO DOS SANTOS. **Avaliação das características do sêmen resfriado de cães das raças Husky Siberiano e Chow Chow criados no semiárido paraibano com a utilização de três diferentes diluidores** [Evaluation of cooled semen characteristics of Husky Siberian and Chow Chow dogs in the semiarid of the Paraíba State with three freezing extenders]. 2013. 37f. Monografia (Medicina Veterinária) - Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande.

Fatores climáticos como o calor e a umidade do ar elevada ou muito baixa atuam como desencadeantes do estresse térmico, concorrendo para um aumento na temperatura corpórea e testicular, influenciando a espermatogênese e refletindo, assim, no potencial reprodutivo do macho. O objetivo do presente estudo foi avaliar as características do sêmen resfriado de cães das raças Husky Siberiano e Chow Chow criados no semiárido paraibano com a utilização de três diferentes diluidores, a saber: água de coco em pó (ACP), leite desnatado (meio de Kenney) e TRIS-gema. Amostras de sêmen de cães das duas raças foram diluídas nos três diferentes diluidores e em seguida, resfriadas a 5 °C. Foram avaliados volume, motilidade progressiva, vigor, concentração e morfologia espermáticas em intervalos de 12 horas, enquanto as amostras apresentaram motilidade e vigor espermáticos. Também foram realizadas análises da integridade da membrana plasmática pelo teste hiposmótico, a intervalos de 12 horas. Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) para as variáveis avaliadas, podendo-se concluir que as condições de temperatura elevada e a baixa umidade do ar presentes no semiárido paraibano não contribuíram para alterar as características seminais de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano neste estudo.

Palavras-chaves: Cães. Sêmen. Diluidores.

ABSTRACT

AZERÊDO, LILIANNE MARINHO DOS SANTOS. **Evaluation of cooled semen characteristics of Husky Siberian and Chow Chow dogs in the semiarid of the Paraíba State with three freezing extenders.**[Avaliação das características do sêmen resfriado de cães das raças Husky Siberiano e Chow Chow criados no semiárido paraibano com a utilização de três diferentes diluidores]. 2013. 37f. Monografia (Medicina Veterinária) - Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande.

Climatic factors like heat and high humidity or very low act as triggers of heat stress, contributing to an increase in body temperature and testicular spermatogenesis influencing and reflecting, so in the male reproductive potential. The aim of this study was to evaluate the characteristics of cooled semen dog breeds Siberian Husky and Chow Chow created in semiarid Paraíba using three different extenders, namely: coconut water powder (ACP), skim milk (through Kenney) and TRIS-egg yolk. Semen samples from dogs of two breeds were diluted in three different extenders and then cooled to 5 ° C. We evaluated volume, motility, vigor, concentration and sperm morphology in intervals of 12 hours, while samples showed sperm motility and vigor. Were analyzed for the integrity of the plasma membrane by hypoosmotic test, every 12 hours. There was no statistically significant difference ($P > 0.05$) for the variables, and it can be concluded that the conditions of high temperature and lower humidity present in semiarid Paraíba not contributed to changes seminal characteristics of dog breeds and Chow Chow Siberian Husky in this study.

Keywords: Dogs. Semen. Thinners

LISTA DE TABELAS

Pág

Tabela 1- Média \pm desvio padrão das características espermáticas observadas no T0 (momento da colheita) de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano criados no semiárido paraibano.....	26
---	----

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1- Colheita de sêmen de cão da raça Chow Chow criado no semiárido Paraibano.....	21
Figura 2- Momento da ejaculação de cão da raça Chow Chow criado no semiárido Paraibano.....	21
Figura 3- Material para avaliação do sêmen de cães.....	23
Figura 4- Amostra de sêmen de cão da raça Husky Siberiano criado no semiárido Paraibano.....	23
Figura 5- Depósitos para transporte de soluções e sêmen de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano.....	24
Figura 6- Amostras de sêmen resfriado de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano diluídos em ACP, Kenney e Tris-gema	24
Figura 7- Espermatozóides positivos ao HOST.....	25
Figura 8- Espermatozóide negativo ao HOST.....	25
Figura 9- Médias do volume de sêmen (mL) de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano semanalmente, criados no semiárido paraibano.	27
Figura 10- Médias da concentração espermática ($\times 10^6$) de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano semanalmente, criados no semiárido paraibano.....	27
Figura 11- Médias da motilidade progressiva (%) de espermatozóides de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano semanalmente, criados no semiárido paraibano.....	28
Figura 12- Médias do vigor espermático, nota atribuída de 0 a 5, de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano semanalmente, criados no semiárido paraibano.....	29
Figura 13- Médias dos defeitos espermáticos totais (%) de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano semanalmente, criados no semiárido paraibano.....	30
Figura 14- Valores da motilidade progressiva de espermatozóides de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano com três diluidores criados no semiárido paraibano nos diferentes tempos de avaliação.....	31

Figura 15-	Valores do vigor espermático de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano com três diluidores criados no semiárido paraibano nos diferentes tempos de avaliação.....	31
Figura 16-	Valores do teste hiposmótico (HOST) de espermatozóides de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano com três diluidores criados no semiárido paraibano nos diferentes tempos de avaliação.....	32

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 A Raça Chow Chow	16
2.2 A Raça Husky Siberiano	16
2.3 Avaliação Andrológica	16
2.4 Avaliação do Ejaculado	17
2.6 Efeito do estresse térmico sobre as características do sêmen	18
2.7 Os diluidores no processo de resfriamento do sêmen	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Animais e local de experimento	21
3.2 Colheita de sêmen	21
3.3 Avaliação do ejaculado	22
3.4 Análise Estatística	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5 CONCLUSÕES	34
6 REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Em 2009, a população de cães no Brasil era de 32 milhões (não estão inclusos os cães errantes) de acordo com a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos, a Anfal Pet. Acredita-se que seja a segunda maior população do planeta, inferior apenas à existente nos Estados Unidos, movimentando um mercado de 14,2 bilhões de reais em 2012, e com expectativa de crescimento. O país ocupa o segundo lugar no mercado mundial, atrás apenas dos EUA, segundo a Abinpet (Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação)

Com o aumento no comércio e na criação de cães de alto valor, houve a necessidade de melhorar a tecnologia da reprodução a fim de desenvolver técnicas que possam auxiliar na melhoria da capacidade reprodutiva e na preservação de gametas.

Dentre as técnicas para melhorar a capacidade reprodutiva, a Inseminação artificial é uma importante ferramenta, uma vez que viabiliza a disseminação acelerada de material genético de alto padrão, possibilitando que, por meio de técnicas como o resfriamento, o sêmen de reprodutores localizados a grandes distâncias possa ser transportado sem que se perca a sua viabilidade. Além disso, a avaliação reprodutiva concomitante, é imprescindível no diagnóstico de alterações no sistema genital que possam interferir na produção espermática.

Diversos fatores, incluindo componentes climáticos externos como calor e umidade do ar elevada, atuam como desencadeantes para o estresse térmico, principalmente em animais cuja raça é oriunda de regiões frias. Esse estresse concorre para um aumento na temperatura corpórea e testicular, influenciando a espermatogênese e refletindo, assim, no potencial reprodutivo do macho.

Com base nos aspectos expostos, é objetivo do presente estudo avaliar as características do sêmen resfriado de cães das raças Husky Siberiano e Chow Chow criados no semiárido paraibano com a utilização de três diferentes diluidores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Raça Chow Chow

De acordo com a Confederação Brasileira de Cinofilia, a CBKC^a (2003), os cães da raça Chow Chow tiveram sua origem na China e são utilizados como cães de guarda e companhia. Esses animais apresentam comportamento tranquilo, sendo considerados bons guardiões e leais. Dentre as suas características apresentam os lábios, a língua e o céu da boca em tom preto azulado, as orelhas são pequenas, eretas e rígidas voltadas para frente e ligeiramente convergentes. O pêlo pode ser longo ou curto sendo o longo muito abundante, denso e eriçado. A textura do pelo é rude e o subpelo é suave e lanoso. A pelagem é particularmente densa em torno do pescoço, onde forma uma juba e, na face posterior das coxas, em fardos culote.

2.2 A Raça Husky Siberiano

Originaram-se nos Estados Unidos das Américas onde eram utilizados como cães de trenó. São animais de porte médio com corpo moderadamente compacto e pelagem densa. Suas orelhas são eretas e a cauda em pincel. Sua inteligência, docilidade e disposição o tornam um companheiro agradável e um cão sempre disposto ao trabalho. A pelagem possui comprimento médio e de aparência bem peluda. O subpelo é macio e denso, de comprimento suficiente para suportar a pelagem de cobertura. Os pêlos de cobertura são retos e suavemente assentados, mas nunca ásperos ou eriçados (CBKC^b, 2003).

2.3 Avaliação Andrológica

O exame andrológico em cães possui grande importância sendo indicado na compra ou venda de reprodutores, seleção de doadores para uso em programas de inseminação artificial ou diagnóstico de patologias do sistema genital masculino (AGUIAR *et al.*, 1994). Através dele podem ser detectadas várias alterações no desenvolvimento do sistema genital, alterações regressivas e progressivas e alterações inflamatórias nos diversos órgãos, bem como distúrbios na libido e na

habilidade de cópula que levam tanto à incapacidade de fertilização como de monta, em vários graus, caracterizando quadros de subfertilidade ou de infertilidade masculina (BARBOSA *et al.*, 2005).

2.4 Avaliação do Ejaculado

Na avaliação do sêmen, avaliam-se as características macroscópicas (volume, coloração, aspecto, odor e pH) e microscópicas (motilidade, vigor, concentração de espermatozoides e morfologia espermática), além das patologias espermáticas que podem ser divididos em defeitos maiores e menores (CBRA, 1998).

O sêmen canino é dividido em três frações diferenciadas. A primeira é a fração pré-espermática, de origem prostática, possui aspecto aquoso e transparente, com volume variando de 0,5 a 5 mL. A segunda fração é rica em espermatozoides, com coloração variando de branco leitoso a translúcido, dependendo da concentração, e o volume varia entre 1 a 4 mL (JOHNSTON *et al.*, 2001). A terceira fração é também de origem prostática, com aspecto aquoso e transparente e volume entre 2,5 a 80 mL, e tem função de facilitar o transporte espermático pela cérvix e aumentar o volume do ejaculado (ENGLAND e ALEN, 1992).

Segundo Vannucchi *et al.*, (1998) o ejaculado do cão apresenta, em condições normais, volume de 1 a 40 mL, cor branco opalescente, pH de 6,3 – 6,7, a motilidade e vigor superiores a 70% e 3, respectivamente, concentração acima de 200 milhões de espermatozoides por ejaculado e a morfologia com 80% ou mais dos espermatozoides livres de alterações estruturais. Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) as características ideais do sêmen de um cão são: volume variável, motilidade maior que 70%, vigor maior que três e concentração espermática total acima de 200×10^6 de espermatozoides.

2.5 Teste Hiposmótico

Segundo Lagares *et al.*, (1998), a membrana plasmática está envolvida em trocas metabólicas com o meio extracelular e, por isso a grande importância do

estudo da funcionalidade da mesma, somado aos parâmetros tradicionais de avaliação da qualidade do sêmen, com a finalidade de aumentar os índices de fertilidade.

O teste hiposmótico (HOST) foi proposto inicialmente com a finalidade de avaliar a atividade bioquímica da membrana plasmática intacta em espermatozoides humanos (JEYENDRAN *et al.*, 1984) e apresenta como princípio a observação de que um espermatozoide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extras e intracelulares (SANTOS *et al.*, 2001). Com o influxo da água para o interior da célula, há edema celular, com dobramento da cauda (JEYENDRAN *et al.*, 1984).

O HOST deve ser considerado um indicador de fertilidade, uma vez que a integridade da membrana plasmática é indispensável para que ocorra fecundação. (MELO, 1999).

2.6 Efeito do estresse térmico sobre as características do sêmen

No macho, a fisiologia reprodutiva é controlada por duas gonadotrofinas secretadas pela hipófise anterior, o LH (hormônio luteinizante) e o FSH (hormônio folículo estimulante), sendo estes dependentes do controle positivo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que é liberado pelo hipotálamo se ligando aos receptores específicos na membrana plasmática da hipófise anterior. (HAFEZ *et al.*, 2004).

Todo mecanismo de controle endócrino da reprodução nos machos pode sofrer influência da variação das épocas do ano. As alterações de luminosidade diária, eventualmente, desencadeiam variações nos níveis plasmáticos de gonadotrofinas e de prolactina (SETCHELL, 1993).

A eficiência reprodutiva é alterada através dos efeitos da temperatura ambiental elevada que produz estresse térmico e que nos machos limita a capacidade de termorregulação testicular necessária para o desenvolvimento normal dos espermatozoides (WEITZE, 2000). Animais com temperaturas corporais elevadas durante períodos de alta temperatura ambiental ou pirexia causada por doença, levam a degeneração testicular e reduzem a porcentagem de espermatozoides normais e férteis na ejaculação (JAINUDEEN e HAFEZ, 2004).

Esse efeito é observado através das alterações da libido e das características dos ejaculados onde são observados menor volume, diminuição da motilidade e aumento das anormalidades espermáticas (RODRÍGUEZ e WALLGREN, 2000).

Entre os fatores ambientais, a temperatura e a umidade relativa do ar exercem papel importante sobre a reprodução, especialmente de animais importados para região edafoclimática diferente daquela de origem (CHEMINEAU, 1986).

2.7 Os diluidores no processo de resfriamento do sêmen

Na criopreservação do sêmen, o diluidor é um fator de grande importância para a manutenção da viabilidade das células espermáticas (MOURA, 2000), através do uso da diluição, o sêmen pode ser refrigerado por alguns dias, e quando reaquecido, utilizado para a inseminação artificial (CUNHA e LOPES, 1997).

Um dos diluidores mais usados para refrigeração de sêmen é o meio à base de leite em pó desnatado e glicose, proposto por Kenney *et al.*, (1975). Esse diluidor já foi testado com sêmen refrigerado de cão por até 72 horas, obtendo resultados satisfatórios: cerca de 70% de espermatozoides com membrana íntegra e 60 % de motilidade e 2 de vigor espermático (CUNHA e LOPES, 2000). O leite é um líquido orgânico com importante propriedade biológica para a conservação dos espermatozoides por possuir certa capacidade tampão, ação bactericida, viscosidade adequada para manutenção dos espermatozoides no meio líquido, e abundância de carboidratos que seriam utilizados pelos espermatozoides na produção de energia, sabe-se que duas substâncias responsáveis por esta característica são: a lactose, que age como elemento energético e a caseína que é uma substância capaz de potencializar a atividade cinética dos espermatozóides (CUNHA, 2002).

A água de coco, por sua vez, tem sido utilizada em biotecnologias da reprodução animal por ser é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas e gorduras neutras (NUNES e COMBARNOUS, 1995). É uma solução indutora da divisão celular e que possui diversos eletrólitos, que conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, proporcionando, os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade de gametas masculinos e femininos criopreservados (BLUME e MARQUES, 1994).

Segundo Nunes e Combarrous (1995), a água de coco é pobre em fosfolípidios e rica em moléculas orgânicas como a prolina, glicina, ácido glutâmico e ácido indol acético (IAA) que favorecem a sobrevivência da célula espermática devido a sua provável ação protetora sobre a membrana plasmática, reforçando sua estrutura molecular.

Diluidores de sêmen à base de água de coco apresentam como vantagens o baixo custo, fácil preparo, além do fato do coco ser abundante no Nordeste do Brasil. Entretanto, a água de coco apresenta dificuldades quando à conservação por longos períodos após sua extração do fruto, limitações na disponibilidade do fruto em regiões onde há a carência do vegetal, além de variações na constituição bioquímica da água de coco entre diferentes frutos. Isto motivou o desenvolvimento do produto água de coco em pó (ACP), onde os constituintes nutricionais da água de coco *in natura* são obtidos por sistema de desidratação a alto vácuo processo denominado nebulização/atomização em um aparelho denominado “Spray Dryer” (NUNES e SALGUEIRO, 2006).

O produto ACP caracteriza-se por possuir composição padronizada, obtido a partir de frutos oriundos de plantações orgânicas certificadas, além de possuir características bioquímicas similares às da água de coco *in natura* (SALGUEIRO *et al.*, 2002).

Outro componente também bastante utilizado na composição dos diluidores de sêmen é a gema de ovo em combinação com o TRIS (tri hidroximetilaminometano). Ela apresenta propriedades nutritivas e protetoras da membrana contra o choque térmico (ENGLAND, 1993) e atua como uma fonte proteica para a célula (SANTOS, 2004). No preparo do Tris-gema são adicionados fontes nutritivas, estabilizadoras e tamponantes como a frutose, lactose, gema de ovo e ácido cítrico (SALVIANO e SOUZA, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e local de experimento

Para a realização do presente trabalho foram utilizados seis cães, sendo três animais da raça Chow Chow e três da raça Husky Siberiano, com idade variando de 1 a 6 anos, oriundos de criadores da cidade de Patos.

O experimento foi realizado no laboratório de Reprodução Animal no Hospital Veterinário (HV), do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), durante os meses de novembro e dezembro de 2011.

3.2 Colheita de sêmen

O sêmen foi colhido pelo método de massagem digital com a mão enluvada (Figura 1) e com um tubo graduado acoplado a um funil (Figura 2). As colheitas foram realizadas na residência dos proprietários, uma vez por semana, durante três semanas, preferencialmente pela manhã, onde também foi registrada a temperatura ambiente.



Figura 1- Colheita de sêmen de cão da raça Chow Chow criado no semiárido paraibano.



Figura 2- Momento da ejaculação de cão da raça Chow Chow criado no semiárido paraibano.

3.3 Avaliação do ejaculado

Imediatamente após a colheita, o sêmen foi mantido a 37°C em banho-maria e avaliado quanto às suas características macroscópicas (volume, coloração, aspecto, odor e pH) e microscópica (motilidade, vigor, concentração de espermatozoides, morfologia espermática e análise da integridade de membrana através do teste hiposmótico). Materiais como lâminas, lamínulas, pipetas e o próprio tubo coletor, foram mantidos previamente aquecidos à temperatura de 37°C em mesa aquecedora (Figura 3).

O volume foi determinado através da leitura do tubo coletor graduado em mL. A coloração e o aspecto foram avaliados visualmente no próprio tubo de coleta (Figura 4). O pH foi mensurado colocando uma gota do sêmen em papel indicador de pH observando, em 30 segundos, a cor correspondente à zona impregnada e comparando à tira de calibração para pH.

A motilidade e o vigor foram avaliados subjetivamente colocando uma gota de sêmen (20 µL) sobre lâmina e sob lamínula em microscópio óptico com objetiva de 10 ou 40x, usando a escala de 0 a 100% e 0 a 5 para motilidade progressiva e vigor, respectivamente.

As amostras para concentração e morfologia espermáticas foram preparadas com a diluição de 10 µL de sêmen em 2 mL de solução de formol salino. A análise de concentração foi realizada por meio da contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer, em microscópio óptico, com aumento de 20x. A avaliação da morfologia espermática foi realizada em microscopia de contraste de fase, pelo método da câmara úmida, em objetiva de 100x, em imersão, onde foram contadas 100 células espermáticas.



Figura 3- Material para avaliação do sêmen de cães.



Figura 4- Amostra de sêmen de cão da raça Husky Siberiano criado no semiárido paraibano.

A primeira análise do ejaculado foi denominada de Tempo Zero (T0) e, após esta, o sêmen foi dividido em três alíquotas de 1 mL cada, mantidas em tubos graduados do tipo Falcon e, em seguida, cada uma das alíquotas foi diluída em igual volume de diluidor à base de água de coco em pó (ACP) (Diluidor 1), leite desnatado (Meio de KENNEY) (Diluidor 2) e Tris gema (Meio TRIS) (Diluidor 3). Após a diluição, as amostras foram mantidas em banho Maria à 37°C, em caixa de isopor (Figura 5) e transportadas até o laboratório para as análises utilizando o teste hiposmótico (HOST).

As amostras de sêmen diluídas, após chegar ao laboratório, foram mantidas sob refrigeração, em geladeira a 5°C (Figura 6), onde, a cada 12 horas, foram avaliadas quanto à sua motilidade progressiva e vigor espermático, além do teste de HOST.

Para a realização do teste hiposmótico, uma alíquota (20µL) do sêmen refrigerado, acondicionado em tubo de microcentrífuga, foi incubado em 1mL de solução hiposmótica (150mOSM) e mantido em banho-maria à 37°C, durante 30 minutos. Após a incubação, as células espermáticas foram avaliadas quanto à sua morfologia, sob microscopia de contraste de fase, em preparação úmida, em objetiva de 100x com imersão, onde foram contadas 100 células espermáticas. As

células espermáticas íntegras apresentaram enrolamento de cauda e foram classificadas como positivas ao HOST (Figura 7). As células não reagentes ao HOST apresentaram cauda disposta em linha reta (Figura 8).



Figura 5- Depósitos para transporte de soluções e sêmen de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano.



Figura 6- Amostras de sêmen resfriado de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano diluídos em ACP, Kenney e TRIS- gema.

As análises de motilidade progressiva, vigor espermático e teste hiposmótico (HOST) foram realizadas a intervalos de 12 horas, até o momento em que, na amostra fosse detectado motilidade progressiva e vigor zero.

Os tempos de avaliação foram denominados como: Tempo Zero (T0), correspondente ao momento das avaliações, imediatamente após a colheita do ejaculado, antes da diluição; Tempo 1 (T1), 12 horas após a colheita do ejaculado; Tempo 2 (T2), 24 horas após a colheita do ejaculado, Tempo 3 (T3), 36 horas após a colheita do ejaculado e assim por diante, de acordo com o tempo de sobrevivência das células espermáticas.



Figura 7- Espermatozoides positivos ao HOST.



Figura 8- Espermatozóide negativo ao HOST.

3.4 Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo programa SAS System e as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Para o sêmen *in natura* foi realizado um delineamento inteiramente casualizado no fatorial 2 x 3, sendo duas raças e 3 semanas de colheitas.

Já para o sêmen diluído foi realizado um delineamento inteiramente casualizado em um fator 2 x 3 x 3, sendo duas raças, três diluidores e três semanas de colheitas. Estes dados foram analisados em regressão linear.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação das características espermáticas de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano, não apresentaram diferença significativa em função das raças ($P>0,05$) para os valores de volume (mL), concentração espermática ($\times 10^6$), vigor espermático (0-5) e defeitos espermáticos totais (%), conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1- Média \pm desvio padrão das características espermáticas observadas no T0 (momento da colheita) de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano criados no semiárido paraibano.

Características espermáticas	Raças	
	Chow Chow	Husky Siberiano
Volume (mL)	2,46 \pm 0,81	2,46 \pm 0,98
Concentração ($\times 10^6$)	596,94 \pm 616,99	139,72 \pm 84,88
Motilidade (0-100%)	79,44 ^a \pm 8,07	74,44 ^a \pm 5,27
Vigor (0-5)	3,88 ^a \pm 0,82	3,27 ^b \pm 0,56
Defeitos totais (%)	20,00 \pm 16,86	16,67 \pm 16,09

Médias com letras diferentes na linha são diferentes ($P<0,05$)

As variáveis volume de sêmen (mL) e concentração espermática ($\times 10^6$) apresentaram valores semelhantes em ambas as raças estudadas, em função das semanas. O volume foi em média 3,10 \pm 0,36 ,2,36 \pm 0,70 e 1,93 \pm 0,98 mL para a raça Chow Chow e 2,50 \pm 1,50, 2,33 \pm 1,15 e 2,56 \pm 0,51 mL para a raça Husky Siberiano, nas três semanas do experimento, respectivamente, não diferindo significativamente ($P>0,05$) (Figura 9). Por sua vez, os valores da concentração espermática ($\times 10^6$) foram para a raça Chow Chow 572,50 \pm 495,46, 508,33 \pm 600,17 e 710 \pm 940,83 ($\times 10^6$) e 107,50 \pm 80,11, 168,33 \pm 92,91 e 143,33 \pm 104,71 ($\times 10^6$) para a

raça Husky Siberiano, nas três semanas do experimento, respectivamente, não diferindo significativamente ($P>0,05$) (Figura 10).

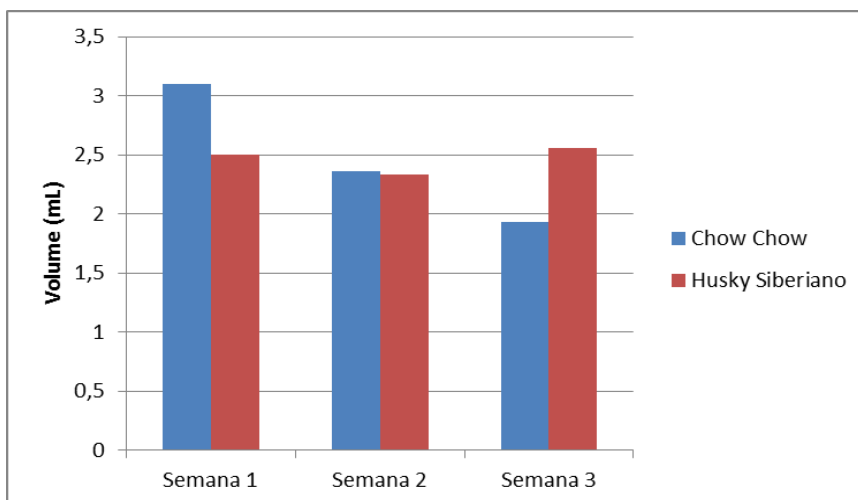


Figura 9- Médias do volume de sêmen (mL) de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano semanalmente, criados no semiárido paraibano.

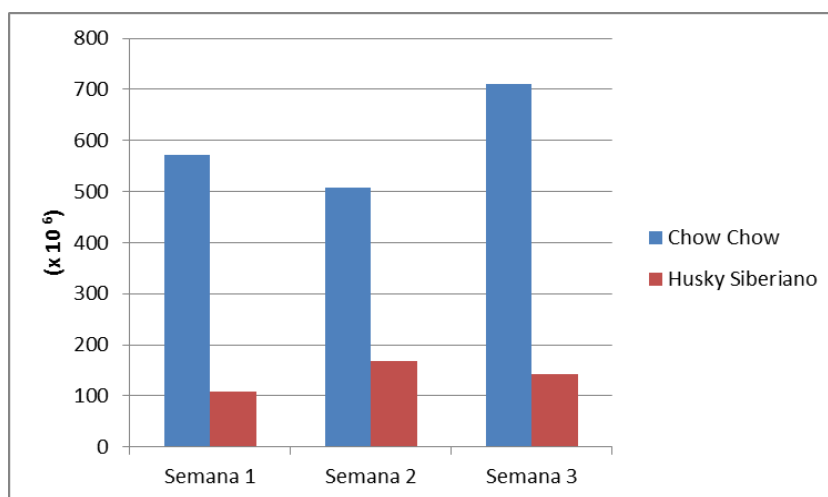


Figura 10- Médias da concentração espermática ($\times 10^6$) de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano semanalmente, criados no semiárido paraibano.

No tempo zero (T0), imediatamente após a colheita, a variável motilidade progressiva (%) também apresentou valores semelhantes em ambas as raças, com média de $86,66 \pm 5,77$, $78,33 \pm 7,63$ e $73,33 \pm 5,77$ % para os cães da raça Chow Chow e $73,33 \pm 5,77$, $73,33 \pm 5,77$ e $76,66 \pm 5,77$ % para os da raça Husky Siberiano, respectivamente nas três semanas em que o experimento transcorreu, não diferindo significativamente ($P > 0,05$). Esses valores estão representados na figura 11.

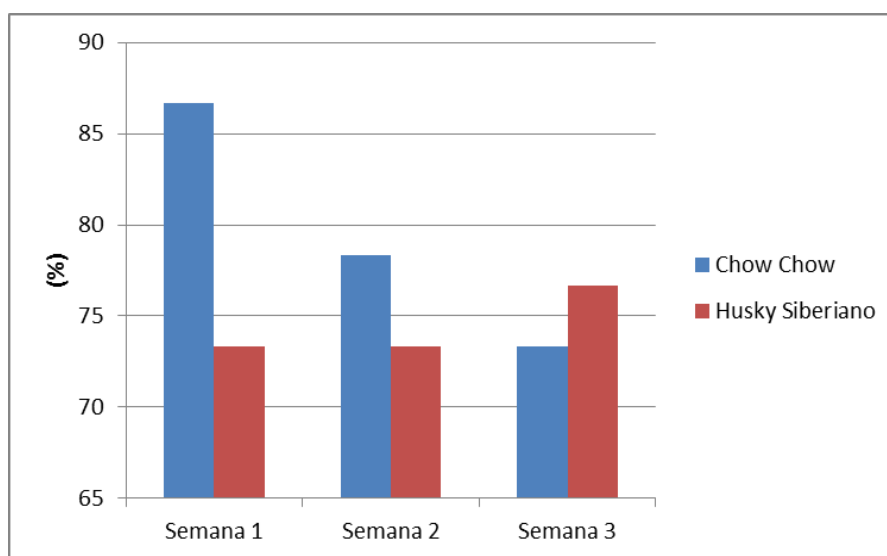


Figura 11- Médias da motilidade progressiva (%) de espermatozoides de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano semanalmente, criados no semiárido paraibano.

Os valores relativos ao vigor espermático (escala de 0-5) no tempo zero (T0) também não diferiram entre as raças em função das semanas ($P > 0,05$), com valores médios de $4,66 \pm 0,57$, $3,50 \pm 0,50$ e $3,50 \pm 0,86$, para a raça Chow Chow e $2,83 \pm 0,28$, $3,33 \pm 0,57$, e $3,66 \pm 0,57$ para os Husky Siberiano, respectivamente nas três semanas em que o experimento transcorreu, como pode ser observado na figura 12.

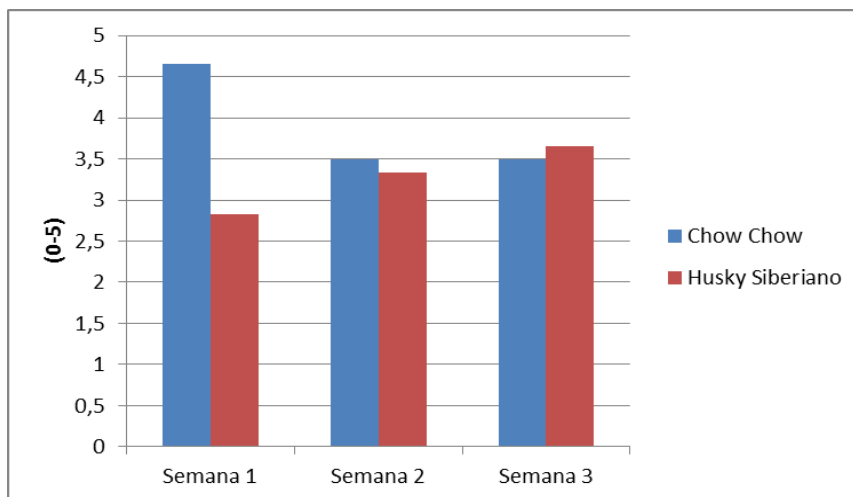


Figura 12-1 Médias do vigor espermático, nota atribuída de 0 a 5, de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano semanalmente, criados no semiárido paraibano.

Os valores obtidos para defeitos espermáticos totais (%) no tempo zero (T0) não diferiram significativamente durante a fase experimental, entre as duas raças estudadas ($P > 0,05$), com valores de $19,66 \pm 9,88$, $17,33 \pm 16,62$ e $23 \pm 27,22\%$ para os cães da raça Chow Chow e $14 \pm 11,53$, $7 \pm 6,55$ e $29 \pm 21,93\%$ para os da raça Husky Siberiano, respectivamente nas três semanas do experimento, conforme demonstrado na figura 13.

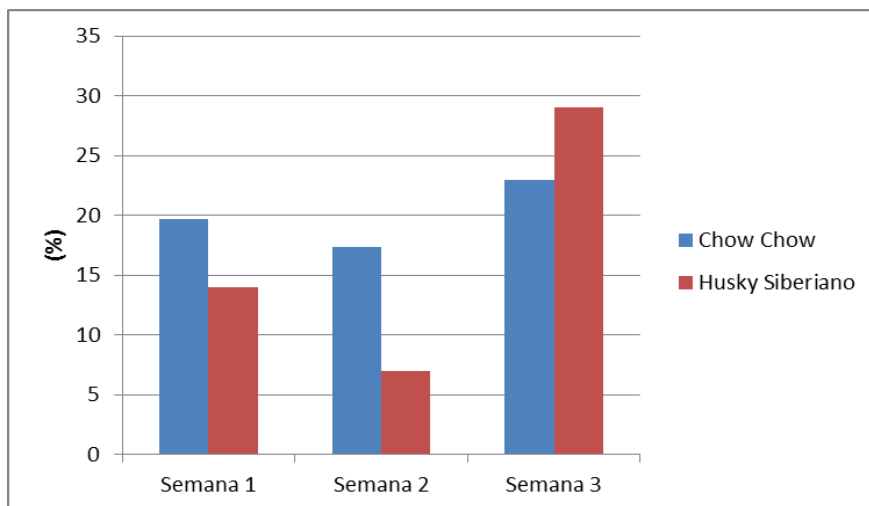


Figura 13- Médias dos defeitos espermáticos totais (%) de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano semanalmente, criados no semiárido paraibano.

Os resultados referentes a motilidade progressiva e vigor espermático de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano, nos diversos momentos de avaliação, utilizando os três diluidores estão demonstrados na figura 14 e figura 15, respectivamente.

Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) para as variáveis motilidade progressiva e vigor espermático com nenhum dos diluidores utilizados neste estudo, nos tempos avaliados. Estes resultados indicaram que não houve diferença nas características seminais entre as duas raças estudadas.

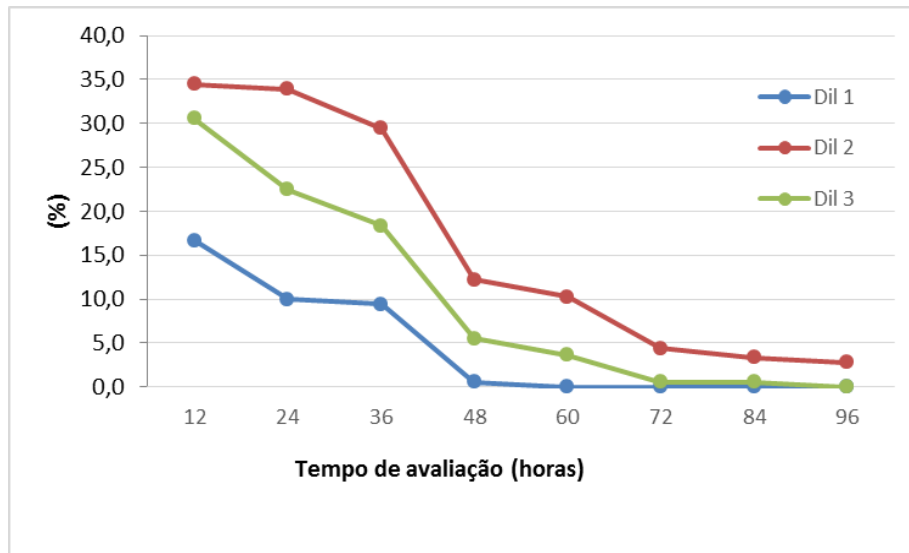


Figura 14- Valores da motilidade progressiva de espermatozoides de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano com três diluidores criados no semiárido paraibano nos diferentes tempos de avaliação.

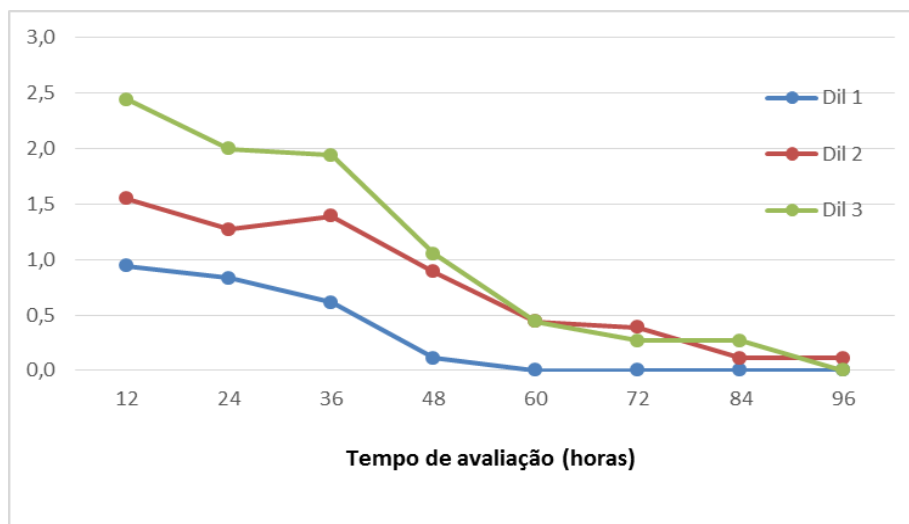


Figura 15- Valores do vigor espermático de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano com três diluidores criados no semiárido paraibano nos diferentes tempos de avaliação.

Os resultados relativos ao teste hiposmótico (HOST) nos diversos tempos de avaliação estão demonstrados na figura 16. Demonstraram que não houve diferença estatística no tempo de sobrevivência espermática com nenhum dos três diluidores avaliados. Ainda, não houve diferença estatística no tempo de sobrevivência espermática entre as duas raças avaliadas nesse estudo.

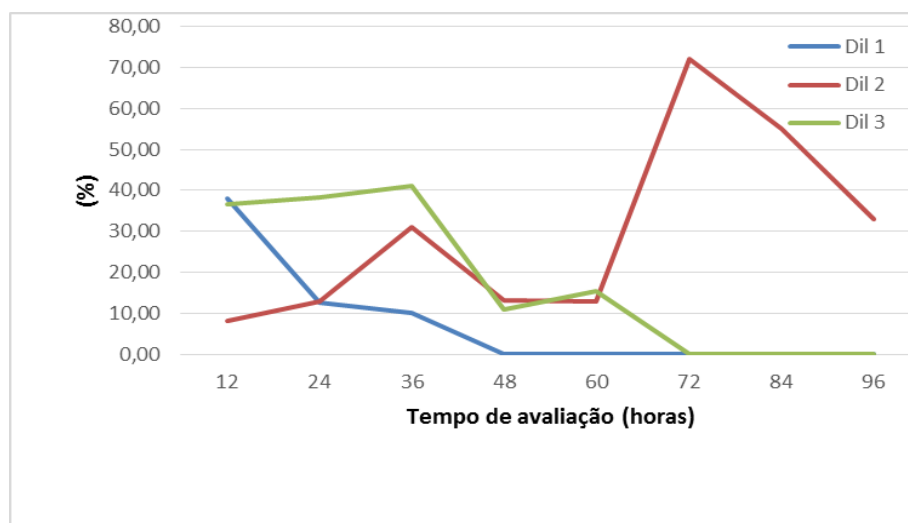


Figura 16- Valores do teste hiposmótico (HOST) de espermatozoides de cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano com três diluidores criados no semiárido paraibano nos diferentes tempos de avaliação.

A espermatogênese normal depende da manutenção da temperatura testicular entre 2 e 6°C mais baixa que a temperatura corpórea. (KASTELIC *et al.*, 1997). O aumento da temperatura testicular diminui a qualidade do sêmen produzido. Esse efeito pode levar a um quadro de degeneração testicular e pode ser desencadeado por diversas situações que vão desde processos inflamatórios na região testicular, até a elevação da temperatura ambiente com consequente estresse térmico (NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

Skinner e Louw (1966), estudando bovinos, determinaram que a temperatura ambiente crítica para a espermatogênese está entre 27°C e 32°C, e exposições

contínuas a temperaturas acima de 30°C podem refletir negativamente na produção espermática.

Considerando que as raças de cães utilizadas neste estudo são originárias de clima frio, era esperada uma diminuição nos parâmetros seminais como motilidade progressiva, vigor, concentração e defeitos espermáticos totais, o que não se concretizou neste estudo. Entretanto, segundo Verstegen *et al.*, (2005) o espermatozóide do cão pode sobreviver, sob refrigeração a 5°C, por um período de até 7 dias.

Neste estudo, o tempo máximo onde observou-se motilidade progressiva em uma amostra de sêmen, sob refrigeração foi de 96 horas, nas duas raças estudadas. Esse fato pode sugerir um reflexo da temperatura ambiente à qual os animais estão submetidos, uma vez que, de acordo com Brasil (1992), o município de Patos, localizado na região semiárida do estado da Paraíba, e inserido no polígono das secas, apresenta clima quente e seco, com poucas chuvas. O mês mais quente é Dezembro com média mínima de 20,4°C e média máxima de 32,7°C, já o mês mais frio é Julho com média mínima de 17,1°C e média máxima de 28,1°C.

Durante o período experimental, a média de temperatura ambiente registrada no momento das colheitas foi de 31°C, já no período da manhã. Essas temperaturas elevadas, segundo relatos dos proprietários, provocaram estado de estresse nos animais, manifestado por respiração ofegante e inquietação, o que exigia, em grande parte dos relatos, a utilização de meios como ventiladores, ou mesmo ar refrigerado para diminuir o desconforto térmico dos animais.

Observou-se também neste estudo que, à medida que os tempos do tratamento aumentavam os resultados do teste hiposmótico diminuíram para o sêmen diluído em ACP, que é o esperado. Entretanto, para os diluidores Kenney e Tris houve um aumento nos valores. Isso ocorreu devido o tempo de sobrevivência das células espermáticas de alguns cães que eram superior a outros. Permitindo que apenas estes continuassem no teste o que fez aumentar esses valores.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e sob as condições do presente estudo, pode-se concluir que:

- As características seminais dos cães das raças Chow Chow e Husky Siberiano criados no Semiárido Paraibano estão dentro dos parâmetros descritos na literatura.
- Não houve influência da temperatura ambiente sobre as características seminais de cães de raças Chow Chow e Husky Siberiano criados no semiárido Paraibano avaliados pelo teste hiposmótico neste estudo.
- Os três diluidores utilizados neste estudo demonstraram ser eficientes na manutenção do sêmen de cães sob refrigeração.

6 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P.H.P.; COSTA, M. E. L. T.; ABREU, J. J.; ABREU, C. P. Coleta e avaliação de sêmen canino. **Arquivos Brasileiros de medicina veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 537-544, 1994.
- BARBOSA, R.T.; MACHADO, R; BERGAMASCHI, M.A.C.M. A importância do exame andrológico em bovinos. **Circular Técnica 41**. EMBRAPA, 2005: 1-13.
- BLUME, H.; MARQUES Jr, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v.18, p.97-104, 1994
- BRASIL. Secretaria Nacional de Irrigação. Departamento Nacional de Meteorologia. **Normas Climatológicas: 1961-1990**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1992. 84 p.
- CBKC^a. **Padrão Oficial da Raça Chow Chow**. 2003. Disponível em: <<http://www.cbkc.org/index.htm>>. Acesso em: 16 de março de 2011
- CBKC^b. **Padrão Oficial da Raça Husky Siberiano**. 2003. Disponível em: <<http://www.cbkc.org/index.htm>>. Acesso em: 16 de março de 2011
- CBRA, **Manual para exame e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- CHEMINEAU, P. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. II. Male mating behavior, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reproduction, Nutrition and Development*, Paris, v. 26, n. 2A, p. 453-460, 1986. In: SANTOS, D. O; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros escrototesticulares e de semen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1835-1841, set. 2000.
- CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. D. Estudo da viabilidade do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicina-gema. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v. 21, n. 2, p. 68-71, 1997.
- CUNHA I. C. N.; LOPES, M. D. Estudo do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores a base de leite e glicina-gema. **Revista Educação Continuada CRMV/SP**, v.3, p.37-42, 2000.
- CUNHA, I.C.N. Atualidades na inseminação artificial na espécie canina. In: _____. **Criopreservação do sêmen de cães**. Tese (doutoramento) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2002.
- ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 47, p. 243-255, 1993. In: SILVA, A. R.; SOARES, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Comparação entre água de coco em pó (ACP) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**. v. 43, n. 6, p. 767-774, 2006.

ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, v.37, p.373-81, 1992.

HAFEZ, E.S.E.; JAINUDEEN, M.R.; ROSNINA, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: HAFEZ, B e HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004

JAINUDEEN, M.R.; HAFEZ, E.S.E. Falha Reprodutiva em Machos. In: HAFEZ, B e HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 279-289.

JEYENDRAN, R.S.; VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M; CRABO, B.G; ZANEVELD, L.J. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. 1984. In: ALVES, S.G.G. **Avaliação do sêmen de caprinos da raça böer por meio do teste hiposmótico**. Salvador, Bahia, 2006. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal dos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2006.

JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OSLON, P.N.S. Semen collection, evaluation and preservation. In: _____. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. cap.16, p.287-306

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 255-61, 1997.

KENNEY RM, BERGMAN RV, COOPER WL, MORSE GW. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: **Annual convention American Association Equine Practitioners**, 21, 1975, Boston. Proceedings... Boston: AAEP, p.327,1975

LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H. Preservação do sêmen fresco eqüino: avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. 1998. In: ALVES, S.G.G. **Avaliação do sêmen de caprinos da raça böer por meio do teste hiposmótico**. Salvador, Bahia, 2006. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal dos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2006.

MELO, M. I. **Teste Hiposmótico na avaliação do sêmen equino**. 1999. 67p. Tese (Doutorado em Veterinária) – Faculdade de medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

MOURA, C. S. Utilização de diferentes diluentes na criopreservação do sêmen de cão. 2000. In: SILVA, M. G. S.; PAPA, F. O.; GUERRA, M. M. P.; MOURA, C. S.; WISCHRAL, A. Efeito do diluidor “baken” modificado na longevidade espermática de cão. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 44-46, jan./abr. 2006.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L., **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 137p.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluente do sêmen de mamíferos domésticos. In: **Simposio Nacional De Biotecnologia Da Reprodução De Mamíferos Domésticos**, 1995, Fortaleza. Anais... Fortaleza

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, n. 43, p.58-60. 2006

RODRÍGUEZ, H. M; WALLGREN, M. Factores que influncian la calidad espermática en verracos em inseminação artificial em suínos. 2000. In: HENAO RESTREPO, G. et al. EFECTO DEL CLIMA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE PORCINOS EN UNA ZONA DE BOSQUE HÚMEDO TROPICAL. **Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín** [online]. 2004, vol.57, n.2, p. 2355-2372. ISSN 0304-2847.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.L.P.; VIEIRA, V.L.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v.5, p.96-98, 2002

SALVIANO, M.B; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.159-167, jul./set. 2008.

SANTOS, A.D.F; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, 2001.

SANTOS, I. W. **Albumina sérica como fonte protéica do diluidor Tris (hidroximetil amino metano) para congelação do sêmen canino**. 2004. 63p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2004.

SETCHELL, B.P. Male reproduction. In: KING, G.J. **Reproduction in domesticated animals**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1993, p. 82-127.

SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in Bos indicus and Bos Taurus cattle. *Journal of Applied Physiology*,21:1784-1790, 1966.In: GARCIA, O. S. **Estudo experimental da insulação testicular em bubalinos**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2009.

VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. Avaliação Seminal em Cães. **Clínica Veterinária**. São Paulo, ano III, n. 15, p. 22-26, julho/agosto, 1998.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: In vitro and in vivo studies. **Theriogenology** 64 (2005) 720–733.

WEITZE, K. F. Infertilidade estacional no suíno. 2000. In: HENAO RESTREPO, G. et al. EFECTO DEL CLIMA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE PORCINOS EN UNA ZONA DE BOSQUE HÚMEDO TROPICAL.

Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín [online]. 2004, vol.57, n.2, p. 2355-2372. ISSN 0304-2847.