

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

MONOGRAFIA

Revisão de literatura

Tecnologia de sêmen em cães

Larissa Nascimento de Carvalho

2009



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

MONOGRAFIA

REVISÃO DE LITERATURA

Tecnologia de sêmen em cães

Larissa Nascimento de Carvalho
Graduanda

Norma Lúcia de Souza Araújo
Orientadora

Patos - PB
Abril, 2009

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CAMPUS DE PATOS - UFCG

C244t
2009

Carvalho, Larissa Nascimento.

Tecnologia de sêmen em cães – Revisão de Literatura/ Carvalho,
Larissa Nascimento. – Patos: CSTR/UFCG, 2009.

31p.

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 – cães - Monografia. 2 – Reprodução de cães.

I - Título

CDU: 636.082:636.7



Biblioteca Setorial do CDSA. Maio de 2022.

Sumé - PB

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

LARISSA NASCIMENTO DE CARVALHO
Graduanda

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

APROVADO EM 17/04/2009

EXAMINADORES:



PROF.^a DR.^a NORMA LÚCIA DE SOUZA ARAÚJO



PROF. DR. PEDRO ISIDRO DA NÓBREGA NETO



PROF. ADÍLIO SANTOS AZEVEDO

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
Cydamar Caputo e Wilma Carvalho,
e minhas irmãs Tatiana e Carolina.
Dedico esta monografia com mais puro
e sincero amor a vocês.
Família é a base de tudo num ser humano.*

AGRADECIMENTOS

É com enorme satisfação que escrevo meus agradecimentos, pois, sou melhor com palavras escritas do que ditas... Assim, posso descrever aqui tudo aquilo que muitas vezes não soube demonstrar corretamente.

Agradeço a meu Deus Pai, criador de tudo e todos, a quem amarei e honrarei eternamente. Acredito fielmente que quem dignifica teu nome e tenta sempre fazer o bem não importando o que ou a quem, terá um caminho sempre iluminado. Creio que meu amor pelos animais é uma benção, um verdadeiro dom. Eis um pensamento que me encanta: "Deus me enviou à terra com uma missão. Só Ele pode me deter, os homens nunca poderão."

Bom, esta parte especial da minha monografia representa o quanto enobrecida eu sou, por ter pais tão batalhadores e especiais, que são meu orgulho e inspiração, sem eles não seria quem sou e muito menos chegaria onde estou hoje. Foram vocês que me ensinaram a ter ideais, princípios de vida e também, a considerar cada perda e cada ganho uma vitória no traçado da minha vida. Que mesmo apesar dos trancos e barrancos, sempre me confortaram e me reergueram todas as vezes que precisei, e olha que foram muitas... Agradeço todos os conselhos, palavras de conforto, paciência enorme e até mesmo os carões que me fizeram seguir em frente, me ensinando a nunca olhar para trás. Então, Cydamar Caputo e Wilma Carvalho, dedico esta monografia com mais puro e sincero amor a vocês. É uma honra ser sua filha caçula. Agora, o senhor e a senhora podem ver que um sonho de criança, pode realmente, se tornar realidade. É como eu sempre falo: amor de pai e filho é sagrado e para toda a eternidade.

Às minhas irmãs amadas, Tatiana e Carolina, que me incentivaram desde o princípio, principalmente quando batia saudades de casa e vinha àquela vontade de jogar tudo para o alto, e graças a Deus Pai, não joguei. E também, agradeço ao meu cunhado Ulisses Nogueira. Obrigada.

Em momento algum posso deixar de mencionar minha amada e falecida avó paterna Maria Serafina. A senhora foi, é e sempre será meu modelo de inspiração, honestidade, força e coragem. Uma mulher realmente guerreira, sinto saudades tuas todos os dias.

Minha avó materna, Lidia Nascimento, sinônimo de bravura e perseverança em minha vida.

Meus padrinhos Relba e Diagóras, são parte de mim e fui abençoada por ser sua afilhada, os considero da minha família. Amo vocês dois.

À minha família: "A família continua a ser fonte primeira e principal de nossa responsabilidade e de nossa educação, o lugar onde recebemos esse "pão de carinho" que nos vai fazendo crescer e viver." (Manuel Madueño)

Minhas amigas de infância e adolescência do colégio Nossa Senhora de Lourdes, pelas quais tenho um amor enorme, em particular quero citar Catarina Sarmento, considero-te minha irmã de coração.

À minha grande amiga Pollyana Sorrentino, és minha melhor e maior amiga, que sempre teve um orgulho imenso por eu fazer Medicina Veterinária. Apesar da distância toda, nunca deixamos uma à outra, sempre torcendo e pensando na outra, temos realmente uma irmandade divina. Engraçado, mesmo se passarmos muito tempo longe, quando nos reencontramos, ainda soltamos as mesmas gargalhadas e tiramos as mesmas brincadeiras como se fosse ontem que tivéssemos nos visto, e o "tanto tempo" tivesse simplesmente nunca acontecido. Sabe o significado de alma gêmea? Bem, a verdade é que percebi que nem sempre vem em forma de casal romântico (homem x mulher), como acontece no nosso imaginário. E sim, pode adentrar à sua vida como uma bela, magistral e duradoura amizade. Também, ao meu grande amigo Francisco Prima. Estes dois são irmãos que não são sangue do meu sangue, mas considero como se fossem, são um verdadeiro presente de Deus.

Cheguei a esta cidade sozinha, sem nunca ter vindo à Patos, sem conhecer nada nem ninguém. Mas, nesses cinco anos, tive a felicidade de encontrar pessoas especiais, e com isso surgiu uma amizade e estímulo mútuo entre nós de suporte e carinho imenso, apesar dos pesares. Em essencial, dentre estas são: João Ricardo, Janaina Keilla, Pamella Jomman, Synara Dantas. Também incluo aqui, Cairo e Tiago Cezar, tivemos o grande prazer de compartilharmos a mesma orientadora, o que nos aproximou ainda mais, gerando assim um apoio e ternura em comum. Euclides Farias, Marlon Bruno e Cláudio Cassiano são pessoas que tiveram e continuam tendo de mim uma grande afeição, obrigada por cada segundo de vossas companhias tão agradáveis.

Lógico que também menciono as minhas queridas e abençoadas flores de pessoas, as minhas companheiras de apartamento. Que sempre vou carregar na minha lembrança, como minhas irmãs de coração. São elas: Ana Lucélia, Fabíola (vizinha), Ionara, Leiliana, Raiara, Raizza e Vanessa. Agradeço por tudo, e principalmente pelo amparo, carinho,

gargalhadas, que me proporcionaram uma grande pitada de alegria na minha vivência aqui, deixando meus dias sempre mais doces.

Quanto aos funcionários da universidade pelos quais tenho uma grande admiração e afeição, um obrigada bem grande para Damião e Tereza. Ajudaram-me sempre com um sorriso nos lábios.

Não posso deixar de mencionar os professores que transmitiram seus conhecimentos grandiosos com competência e responsabilidade, mostrando-se sempre serem pessoas singelas, e que com isso me motivaram a amar e respeitar ainda mais a Medicina Veterinária. Seria muito bom se tivéssemos mais professores com essa qualidade em nosso curso. Citando especialmente: Gildenor, Norma, Pedro Isidro, Rosângela, Solange Absalão e Sara.

À minha orientadora muito querida, Norma Lúcia, na qual considero como uma mãe, onde só conversar com ela já me traz uma paz e harmonia à minha alma. És uma mulher doce e distinta, que se complementa com uma excelente mestra, tanto do aprendizado como da vida. Aonde eu for, vou te levar sempre nesse meu coração.

Meus cachorros, que são os verdadeiros donos do meu coração, são minha fonte de amor, alegria e lealdade sempre. Tenho isso eternamente em minha mente, um tributo ao cão: "O mais altruísta dos amigos, que um homem pode ter neste mundo egoísta, aquele que nunca mostra ingratidão ou deslealdade, é o cão."

Peço mil desculpas se pelo meu esquecimento, não vos mencionei aqui.

Eu sei muito bem que nessa vida não há espaço para fraquejar, e tomo por lema o seguinte provérbio chinês:

"Caia sete vezes, levantar-se oito."

Por fim, assim termino com estas duas citações que me fortalece e sempre me levaram a seguir em frente a cada amanhecer e anoitecer:

"Porque eu sou do tamanho daquilo que sinto, que vejo e que faço. E não, do tamanho que as pessoas me enxergam."

(Carlos Drummond de Andrade)

"Eu acredito, eu luto até o fim. Não há como perder, não há como não vencer."

(Taktarov)

RESUMO

CARVALHO, LARISSA. Tecnologia de sêmen em cães. Trabalho de conclusão de curso – (Monografia - Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Patos, 2009. 31 p.

Atualmente, a criação de cães de raça pura com alto valor comercial, deixou de ser apenas um hobby de poucos para se tornar uma atividade lucrativa ampla. A possibilidade de utilização do sêmen canino criopreservado abriu diversas fronteiras para a criação de cães, permitindo a troca de material genético de alto valor entre regiões distantes e o armazenamento desse material por períodos indefinidos. O presente trabalho apresenta uma revisão literária sobre as diversas tecnologias utilizadas na conservação do sêmen de cães.

Palavras-chave: cão, sêmen, criopreservação.

ABSTRACT

CARVALHO, LARISSA. Technologies of semen in dogs. (Monograph – Course of Veterinary Medicine, Preventive Veterinary Medicine and Animal Health.) – Patos, UFCG. 2009. 31p.

Currently, the dog creation of purebred with high commercial value it is no longer just a hobby of fews and become one activity large and profit. The possibility for the use of frozen canine semen had opened several frontiers for canine breeding, since it allows the exchange of valorous genetic material among distant regions, as well as the storage of that material for undefined periods. This study presents a scientific review about canine semen technologies.

Keywords: dog, semen, conservation.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO LITERÁRIA.....	02
2.1. COLHEITA E ANÁLISE.....	03
2.2 MOTILIDADE ESPERMÁTICA E INTEGRIDADE DO ACROSSOMA COMO PARÂMETROS NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE.....	05
2.3 INFLUÊNCIA DA SECREÇÃO PROSTÁTICA SOBRE A MOTILIDADE ESPERMÁTICA.....	05
2.3.1 INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO NA MOTILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN CANINO NÃO DILUÍDO.....	06
2.3.1.1 INFLUÊNCIA DOS DILUENTES E DO RESFRIAMENTO NA MOTILIDADE E INTEGRIDADE DO ACROSSOMA DO SÊMEN CANINO DILUÍDO.....	06
2.4 MECANISMOS DE LESÃO CELULAR DURANTE O PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO.....	08
2.5 DILUIÇÃO DO SÊMEN.....	11
2.6 AGENTES CRIOPROTETORES DO SÊMEN.....	12
2.7 FONTE DE ENERGIA.....	14
2.8 ANTIBIÓTICOS.....	14
2.9 RESFRIAMENTO.....	14
2.10 CONGELAMENTO.....	15
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01. Coleta manual de sêmen no macho.....	03
Figura 02. Fração espermática do sêmen canino.....	04
Figura 03. Ilustração da membrana plasmática e sua composição.....	08
Figura 04. Palhetas contendo sêmen congelado.....	16
Figura 05. Botijão de nitrogênio onde o sêmen congelado é armazenado.....	16

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que hoje em dia os cães vão além de ser apenas uma companhia para seus proprietários, estes possuem um papel fundamental na sociedade onde podem ser empregados para o salvamento ou resgate, vigilância, zooterapia e como cães guias para deficientes visuais. Contudo, para exercer esse papel é importante que os animais possuam boa qualidade genética e específica, daí o grande valor de se obter biotecnologias cada vez melhores que assegurem essa qualidade.

Atualmente, a criação de cães de raça pura com alto valor comercial, deixou de ser apenas um hobby de poucos para se tornar uma atividade lucrativa ampla. E com seu crescimento mundial nestes últimos anos, incentivou também o interesse de aumentar a eficácia da biotecnologia da reprodução, com a finalidade de desenvolver técnicas que possam manter a viabilidade da célula espermática durante o resfriamento e criopreservação do sêmen canino.

Os estudos primários relacionados à conservação do sêmen e inseminação artificial (I.A) foram desenvolvidos por Lázaro Spallanzani, este foi o primeiro cientista a investigar e realizar inseminação artificial em mamíferos, em 1780, no qual inseminou uma cadela, e disto nasceram três filhotes vivos e normais. Alguns anos depois, cientistas russos demonstraram que a fecundação era possível mesmo quando o plasma seminal era substituído por um meio artificial antes da inseminação (MIES FILHO, 1987).

A inseminação artificial é uma das biotécnicas mais antigas já utilizadas pelo homem, sendo hoje, uma ferramenta de grande eficácia no sentido de viabilizar o melhoramento e preservação de material genético, evitar o risco de doenças sexualmente transmissíveis, poupar o animal do stress causado pelo transporte para o ato do acasalamento, aumentar a eficiência reprodutiva, além de facilitar a disseminação de material genético de alto valor a um custo reduzido.

Comparado com o sêmen congelado, a utilização de sêmen resfriado na I.A, apresenta vantagens, uma vez que não necessita de técnicas e nem equipamentos sofisticados e, quando da deposição intravaginal, mantém índices satisfatórios de fertilidade, comparado com a inseminação intrauterina com sêmen congelado. (ROTA *et al.*, 1995)

Contudo, para obtenção do sucesso em uma I.A é indispensável ter meios diluidores que garantam as condições de sobrevivência para a célula espermática, além de manter a sua motilidade, auxiliando assim na preservação da membrana plasmática, que poderá sofrer alterações devido às mudanças de temperatura.

É importante mencionar que nem todos os reprodutores possuem sêmen com características ideais para congelamento (GUNZEL & KRAUSE, 1986), sendo assim necessário o resfriamento para se manter viável.

Os principais fatores que determinam os índices de fertilidade, obtidos com a inseminação artificial são: a fertilidade dos reprodutores, a maneira com que o sêmen é colhido e manipulado, a habilidade do inseminador, o manejo das fêmeas (momento da inseminação), o tipo de sêmen empregado (fresco, refrigerado e congelado), a dose inseminante e a técnica de inseminação empregada.

O presente trabalho possui como objetivo fazer uma revisão literária sobre a tecnologia da reprodução utilizada na conservação do sêmen canino.

2. REVISÃO LITERÁRIA

Diferente das fêmeas, que liberam poucos ou um oócito a cada ciclo estral, os machos liberam milhões de espermatozóides a cada cópula. O tempo de sobrevivência, tanto do oócito quanto dos espermatozóides, é relativamente curto e a fertilização depende primariamente de um transporte sincronizado de gametas no trato reprodutivo feminino.

RJ A inseminação na espécie canina também pode ser utilizada como uma alternativa para animais impossibilitados de realizar monta natural por problemas anatômicos e comportamentais, bem como para prevenção de transmissão de agentes infecciosos e uso de sêmen refrigerado e congelado (FELDMAN & NELSON, 1996). A aplicação de sêmen fresco ou refrigerado no momento da inseminação tem apresentado bons resultados, aproximando-se dos índices obtidos com a monta natural. Entretanto, os resultados conseguidos com o uso do sêmen congelado não são muito satisfatórios (LINDE-FORSBERG & FORSBERG, 1989).

RL Vários fatores contribuem para um perfeito transporte espermático, incluindo a contração uterina que ocorre no momento da cobertura ou inseminação, devido à presença de prostaglandina no sêmen e a liberação de ocitocina pela hipófise (HUNTER, 1999).

Foi demonstrado que a habilidade dos espermatozóides, provenientes de sêmen congelado, de atingirem o oviduto, particularmente a região da ampola, é menor do que de sêmen fresco e esta dificuldade no transporte espermático do sêmen congelado, pode ser devido a alterações bioquímicas e físicas na célula espermática (BARDER, 1982).

px Diversas metodologias têm sido descritas para a congelação do sêmen de cães e variam de acordo com o diluente, protetores de resfriamento e agentes crioprotetores empregados, preconizando o uso de diferentes velocidades de congelação. Em todas, busca-se minimizar o dano causado ao espermatozóide pelo processamento, visando recuperar um máximo possível de espermatozóides viáveis (STROM *et al.*, 1997).

O método de criopreservação de sêmen canino mais usual é aquele descrito por Andersen (1975), onde foi realizada a diluição do sêmen a 37°C em TRIS (trihidróximetil-amino metano) acrescido de gema de ovo e glicerol. Em seguida, foi procedido um período de equilíbrio de três horas, seguido do envase em palhetas plásticas e a exposição aos vapores de nitrogênio para congelação.

2.1 COLHEITA E ANÁLISE

De um modo geral, utiliza-se para a inseminação artificial um macho de escolha do proprietário da cadela a ser inseminada. Entretanto, com o surgimento dos bancos de sêmen canino, preconiza-se a realização de uma seleção dos animais doadores (ENGLAND, 1993).

Por essa razão, a seleção de reprodutores deve ser feita através de uma detalhada anamnese, verificando-se o desempenho reprodutivo anterior do macho e problemas de saúde atuais ou prévios. Deve também ser procedido um cuidadoso exame clínico geral e andrológico, que deve incluir a inspeção e palpação dos órgãos reprodutivos, observando-se principalmente o tamanho e a consistência testicular (FELDMAN E NELSON, 1996).

RL O sêmen é facilmente colhido de cães, em especial daqueles com experiência prévia de acasalamento. A presença de uma cadela em estro pode melhorar a qualidade do ejaculado, particularmente no caso de cães inexperientes ou tímidos. Pode-se ainda congelar zaragatoas impregnadas de secreções vaginais de cadelas em estro (SILVA, 2001) ou impregnadas com o feromônio sintético metil- ρ -benzoato (GOODWIN *et al.*, 1979),

RL Para a colheita, pode-se utilizar a vagina artificial ou coleta manual. Barlett (1962) descreve que a técnica mais recomendada é a massagem manual do bulbo peniano, que se faz facilmente quando o pênis está semi-ereto. O volume do sêmen de cães varia de acordo com a raça, sendo em média de 1 a 30 ml. Um bom ejaculado possui coloração branca opalescente, pH entre 6,3 e 6,7, com motilidade progressiva retilínea acima de 70%, e concentração espermática em torno de 3.000.000 por ml de sêmen.



Figura 01. Coleta manual de sêmen no macho.

(Fonte pessoal, foto cedida pela Profª Drª Norma Lúcia)

RL Após a colheita é necessária a análise detalhada do ejaculado. São analisados o volume, cor, pH, motilidade progressiva retilínea e concentração total. Deve-se mergulhar o recipiente com o sêmen em banho-maria a 37°C, uma vez que é a temperatura normal do sêmen. Segundo Christiansen e Schmidt (1988) o choque térmico é uma das maiores causas de insucesso na I.A, tanto com sêmen fresco ou congelado.

RL O ejaculado canino é naturalmente dividido em três frações distintas. A primeira fração consiste em um fluido claro originado na próstata e supõe-se ser responsável pela limpeza do canal uretral (ENGLAND E ALLEN, 1992). A segunda fração, rica em espermatozóides, é de origem testicular e apresenta volume variável conforme o tamanho testicular e a variação individual, possuindo aspecto turvo, leitoso e opalescente (CHRISTIANSEN & SCHMIDT, 1988). A terceira fração é o fluido prostático que deve ser claro e facilmente distinguível da fração espermática. Apresenta um grande volume e serve como um meio diluidor natural proporcionando o transporte dos espermatozóides no trato genital da cadela (ENGLAND E ALLEN, 1992).

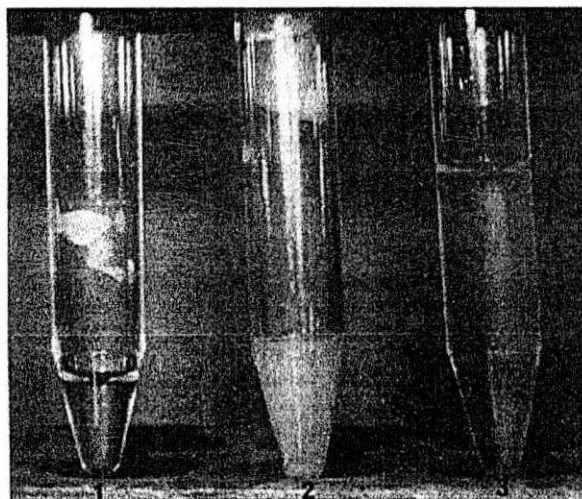


Figura 02. Fração espermática do sêmen canino.
(Fonte pessoal, foto cedida pela Profª Drª Norma Lúcia)

2.2 MOTILIDADE ESPERMÁTICA E INTEGRIDADE DO ACROSSOMA COMO PARÂMETROS NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE

É usada como parâmetro na avaliação da qualidade do sêmen, a motilidade das células espermáticas, que serve para avaliar a capacidade de um diluente quando utilizados na conservação do sêmen. Para que as células espermáticas consigam atravessar a zona pelúcida do óvulo no momento da fecundação é fundamental que elas tenham boa motilidade e seus acrossomas íntegros (MAHI e YANAGIMACHI, 1978).

É durante o armazenamento do sêmen a baixas temperaturas que surgem variadas alterações nas membranas dos espermatozóides, principalmente no acrossoma ou também chamado de capuchão cefálico, o que se assemelha ao processo de reação do acrossoma. E justamente por esse motivo, a observação da integridade acrossomal é extremamente importante quando se faz necessária a conservação do sêmen.

No cão foi encontrada relação entre motilidade espermática e integridade acrossomal no sêmen fresco não diluído, o que não foi observado em amostras de sêmen diluído e congelado (MESSIAS, 2000)

2.3 INFLUÊNCIA DA SECREÇÃO PROSTÁTICA SOBRE A MOTILIDADE ESPERMÁTICA

A correlação de dependência da motilidade espermática com a fonte de energia ATP (trifosfato de adenosina) é amplamente conhecida e relatada em várias espécies (MULTAMÄKI *et al.*, 1980) sendo que o trabalho de Brackett e Williams (1967) contribuiu na determinação da concentração de ATP no sêmen canino.

A liberação de energia pela desfosforilação do ATP é catalizada pela adenosina trifosfatase (ATPase), que se encontra na peça intermediária do espermatozóide. Das inúmeras fosfatases encontradas no plasma seminal foram encontradas duas monofosfoesterases e seu local de produção; a fosfatase ácida é sintetizada pela próstata e a fosfatase alcalina pelo epidídimo e pelos ductos deferentes (MESSIAS, 2000)

Segundo Smith (1975), este verificou que o volume do plasma seminal do ejaculado do cão é, quase que em sua totalidade, fornecido pela próstata, o que vem de encontro com resultados obtidos por England e Allen (1990), quando também observaram que a primeira e a terceira frações seminais do ejaculado do cão são produzidas pela próstata, observando efeitos deletérios à célula espermática quando as mesmas foram diluídas nessas frações.

Günzel-Apel e Ekrod (1991) observaram que o aumento da motilidade individual das células espermáticas com adição de secreção prostática foi temporária e que houve ainda maior redução dessa motilidade após 24 horas de diluição e resfriamento, se comparada com outros meios diluidores.

Günzel-Apel e Ekrod (1991) observaram redução na motilidade e na concentração de ATP em amostras de sêmen canino não diluídas e nas diluídas com secreção prostática quando comparadas com amostras diluídas em TRIS-gema.

A utilização da secreção prostática no congelamento do sêmen canino, da mesma forma que no resfriamento, também é alvo de estudos. Em temperatura de congelamento de -18°C , Nothling *et al.* (1995) obtiveram maiores taxas de prenhez nos dois grupos de fêmeas inseminadas intra-uterinamente com adição de 3 a 10 ml de secreção prostática, comparando-se com o grupo inseminado sem secreção.

2.3.1 INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO NA MOTILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN CANINO NÃO DILUÍDO

Foi confirmado durante o armazenamento do sêmen canino fresco a 5°C por 24 horas, que a motilidade progressiva foi de 74% para 40% e, após 72 horas, decresce ainda mais, chegando a valores de 8,4% (GÜNZEL, 1986). Esse fato foi confirmado por Günzel-apel e Ekrod (1991) ao observarem perda de motilidade progressiva dos espermatozóides após 24 horas de armazenamento a 5°C .

Da mesma forma que ocorrem alterações celulares no armazenamento a baixas temperaturas, a conservação do sêmen não diluído a 35°C durante 1 hora levou à imobilidade dos espermatozóides e à alterações morfológicas, ainda sendo constatado que a conservação a 7°C durante 1 hora não acarretou maiores alterações (MESSIAS, 2000)

2.3.1.1 INFLUÊNCIA DOS DILUENTES E DO RESFRIAMENTO NA MOTILIDADE E INTEGRIDADE DO ACROSSOMA DO SÊMEN CANINO DILUÍDO

Um estudo comparativo entre amostras de sêmen canino não diluído e diluído em meio TRIS armazenadas a 5°C , observou-se a superioridade do sêmen diluído. Bouchard *et al.* (1990) compararam sêmen canino diluído com citrato-gema e leite

desnatado-glicose, sendo que a motilidade espermática foi superior com o primeiro diluente (GÜNZEL, 1986).

Através de comparações de amostras de sêmen canino não diluído com amostras diluídas em secreção prostática ou meio TRIS-gema, observou-se redução na motilidade e na concentração de ATP nas amostras não diluídas e nas diluídas com secreção prostática (GÜNZEL-APEL & EKROD, 1991).

A atividade da fosfatase ácida aumentou nas amostras contendo secreção prostática, mas diminuiu nas amostras diluídas em TRIS. A atividade da fosfatase alcalina diminuiu tanto nas amostras adicionadas de secreção prostática, quanto naquelas diluídas em TRIS.

Quando se comparou sêmen canino não diluído com sêmen diluído em TRIS-gema e leite desnatado e os mesmos diluentes com adição de albumina sérica bovina (BSA), observando que amostras diluídas apresentaram menor índice de alterações acrossomais (MESSIAS, 2000)

O transporte ativo de moléculas é uma das características da membrana das células espermáticas. Em condições de hiposmolaridade, o que acontece na verdade é o influxo de água para o interior das células objetivando equilíbrio osmótico, o que leva à aumento do volume celular e deformações da membrana plasmática. Foi Kumi-Diaka (1993) que analisou a correlação positiva e significativa entre os testes hiposmóticos e motilidade, constatando que, em condições hiposmóticas, ocorre edemaciação da cauda das células espermáticas, ocasionando alteração de motilidade.

O emprego da secreção prostática e do plasma seminal na diluição de sêmen canino também é considerado. Rota *et al.* (1995) desenvolveram um estudo da diluição do sêmen em plasma seminal, TRIS-gema e leite-gema, armazenando as amostras a 4°C, constatou que a diluição em plasma seminal resultou num maior índice de espermatozoides deformados, apresentando motilidade nula em 24 horas enquanto que a motilidade e o vigor espermáticos foram maiores em amostras diluídas em TRIS-gema.

England e Ponzio (1996) pesquisaram a utilização de TRIS-gema no resfriamento e congelamento de sêmen canino, sendo que as amostras de sêmen resfriado apresentaram motilidade superior às amostras de sêmen congelado, indicando que a técnica de resfriamento é realmente mais recomendada do que a de congelamento, em situações em que o sêmen em questão será utilizado dentro do período de quatro a cinco dias.

2.4 MECANISMOS DE LESÃO CELULAR DURANTE O PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO

A membrana plasmática do espermatozóide é composta por uma dupla camada de lipídios contendo muitos fosfolipídios polares, além do colesterol. Há também a presença de proteínas que atuam como bomba de íons para mover o cálcio, o sódio e outros íons para fora da célula, ou ainda servem para aumentar as associações com células do trato reprodutor feminino ou atuam como receptores para ligar o espermatozóide ao ovócito (GRAHAM, 1996).

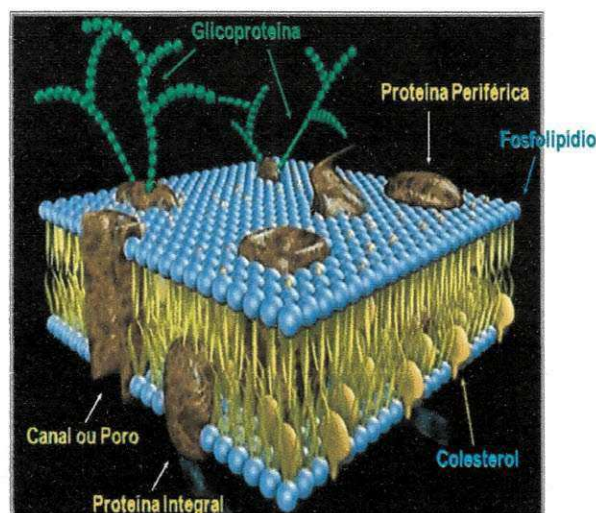


Figura 03. Ilustração da membrana plasmática e sua composição.
(Fonte pessoal, ilustração cedida pela Profª Drª Norma Lúcia)

À temperatura corpórea, a membrana plasmática, apresenta-se na forma de um mosaico fluido, onde as proteínas estão livres para mover-se entre os fosfolipídios bilaterais, uma vez que a própria função requer que as proteínas estejam aptas para mover-se dentro da membrana (JASKO, 1994).

Muitos fatores afetam a fluidez ou a flexibilidade das membranas, e a temperatura é um desses fatores (QUINN, 1985). O resfriamento induz a mudança dos fosfolipídios do estado líquido para o estado cristalino (fase de transição), impedindo sua movimentação lateral e resultando na formação de regiões ou domínios cristalinos (JASKO, 1994 & QUINN, 1985). Restam somente pequenas regiões de lipídios em estado líquido e as proteínas, que servem como poros ou canais através da membrana, atuando como receptores para outras moléculas, são agrupadas no interior desses

domínios de lipídios. A agregação de proteínas pode resultar em aumento da permeabilidade da membrana e diminuição da função metabólica. Supostamente a gema de ovo e as proteínas do leite presentes em muitos diluidores, atuam minimizando essa agregação de proteínas e reduzindo a formação de falhas no arranjo dos lipídios que ocorre na fase de transição (AMANN e PICKETT, 1987).

Durante o processo de criopreservação, a célula espermática é submetida a diversos fatores causadores de estresse. O primeiro desses fatores é o resfriamento da temperatura do corpo (37 °C) para 5 °C. Se esse resfriamento ocorrer de modo inadequado, ocorre o fenômeno conhecido como choque térmico, o qual induz a danos parciais irreversíveis, caracterizados por um padrão anormal de motilidade (movimento circular ou retrógrado), rápida queda na motilidade, danos no metabolismo (diminuição na glicólise e respiração intracelular) e perda de componentes intracelulares (aumento na degeneração do DNA e liberação de enzimas) (JASKO, 1994). Esses efeitos podem ser minimizados no espermatozóide eqüino pelo controle da taxa de resfriamento entre as temperaturas críticas de 19 °C a 8 °C e pela adição de lipídios (gema de ovo) ou lipoproteínas (leite) ao diluidor (GRAHAM, 1996).

Durante o choque térmico, a manutenção do metabolismo e gradiente de íons é prejudicada. Na célula, à temperatura corpórea, as concentrações de íons no interior da célula são ATP-dependentes. Quando a temperatura diminui, a formação de ATP declina, junto com a capacidade de bombeamento de sódio e potássio, causando um desequilíbrio na concentração intracelular desses íons. Ocorre uma despolarização parcial da membrana plasmática e conseqüentemente, influxo de cálcio. O aumento intracelular de cálcio resulta em ativação de fosfolipases, levando à hidrólise de fosfolipídios, posterior aumento da permeabilidade das membranas plasmática e mitocondrial, levando à morte celular (AMANN e PICKETT, 1987).

Quando o sêmen é resfriado abaixo de 0 °C, cristais de gelo no exterior das células espermáticas começam a se formar, resultando em um aumento na concentração de sais no fluido extracelular. A água então se move de dentro da célula para o espaço extracelular, provocando uma desidratação progressiva do espermatozóide. Se a velocidade de saída de água da célula for lenta, haverá a formação de cristais de gelo intracelular, podendo provocar danos ao espermatozóide. Por outro lado, se a velocidade de congelação for muito lenta, a alta concentração de sais proveniente da desidratação,

poderá danificar o espermatozóide. Assim, a velocidade ótima de congelação deverá obedecer a esses dois fatores (AMANN e PICKETT, 1987).

Existe uma relação direta entre a taxa de colesterol:fosfolipídios ou fosfolipídios saturados:insaturados, presentes na membrana plasmática do espermatozóide e sua resistência aos efeitos do choque térmico. Um conteúdo relativamente alto de colesterol ou o aumento na taxa de fosfolipídios saturados:insaturados fornecem à membrana melhor capacidade para resistir ao estresse causado pelo choque térmico (VARNER *et al.*, 1998).

Quando uma suspensão de espermatozóides é resfriada abaixo de 5 °C, inicialmente o meio ao redor do espermatozóide e as próprias células permanecem descongeladas, porque o ponto de congelamento do diluidor e do líquido intracelular estão abaixo de 0 °C. Ocorre um super-resfriamento dessas células e, no ponto entre -5 °C e -15 °C, cristais de gelo se formam no meio extracelular, apesar do espermatozóide permanecer super-resfriado. Aparentemente a membrana plasmática atua como uma barreira impedindo a propagação desses cristais para o interior da célula (PARKS e GRAHAM, 1992). Como a água extracelular está congelada, os sais provenientes desses cristais se acumulam, aumentando a concentração na água que permanece descongelada. Isso aumenta o gradiente osmótico através da membrana plasmática e a água sai da célula, iniciando assim o processo de desidratação do espermatozóide (AMANN e PICKETT, 1987). Altas concentrações de eletrólitos podem desidratar demasiadamente a célula espermática, levando à sua deformação (GRAHAM, 1996).

O exato mecanismo pelo qual o glicerol protege as células não está completamente elucidado (PARKS e GRAHAM, 1992). Amann e Pickett (1987) sugerem que o maior efeito do glicerol é extracelular, onde atua diminuindo a concentração de soluto aumentando a quantidade de água não congelada a uma determinada temperatura.

O glicerol reduz a fluidez da membrana e ainda facilita o rearranjo de sua estrutura (PARKS e GRAHAM, 1992). O glicerol se liga à água, diminuindo o ponto de congelação das soluções, permitindo que a célula se desidrate mais lentamente e, conseqüentemente, reduzindo a concentração de soluto no líquido residual.

Em algumas concentrações todos os crioprotetores são tóxicos para as células (FAHY, 1986). O glicerol pode ser mais deletério ao espermatozóide durante o processo de descongelação do que na congelação. Durante o resfriamento, o glicerol entra na

célula e no descongelamento se move da célula para o meio extracelular. Quando a permeabilidade da membrana plasmática é insuficiente para permitir esse movimento, o resultado é lesão permanente. Os crioprotetores também alteram a polaridade do ambiente celular e a permeabilidade das membranas (AMANN e PICKETT, 1987).

2.5 DILUIÇÃO DO SÊMEN

Independentemente da espécie, o uso dos meios diluidores tanto para resfriar como para congelar o sêmen são de extrema importância. A composição correta do meio diluidor é vital para conservação do sêmen e deve ser determinada para cada espécie. Foote (1964), foi um dos primeiros pesquisadores a investigar sistematicamente a combinação e a quantidade de vários componentes dos diluidores para a preservação do sêmen de cão.

Os diluentes hipertônicos são menos prejudiciais aos espermatozoides que os hipotônicos; por isso a maioria dos diluentes recomendados para congelamento do sêmen canino são hipertônicos em relação ao plasma seminal. Os diluentes hipertônicos atuam reduzindo a água intracelular antes da congelamento, diminuindo a formação de gelo intracelular (SILVA, 2007).

Um dos diluidores mais usados para refrigeração de sêmen atualmente é o meio à base de leite desnatado e glicose. Esse diluidor já foi testado por Cunha e Lopes (2000) 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.

Um bom diluidor tem que conter fontes energéticas para o espermatozoide, estabilizar o pH do meio (ENGLAND, 1993; LINDE-FORSBERG, 1991), preservar a reação acrossômica (SIRIVAIDYANPONG *et al.*, 2000), manter a pressão osmótica e concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos do sêmen, prevenir o crescimento de bactérias, proteger a célula do choque térmico durante o resfriamento e ainda possuir crioprotetores que reduzam os danos celulares durante o resfriamento e pós-resfriamento ou congelamento e pós-congelamento (COCANNON e BATTISTA, 1989)

Estudos têm relatado a utilização de diferentes meios diluidores na criopreservação de sêmen canino (LINDE-FORSBERG, 1991; ROTA *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004), dentre esses meios

diluidores encontram-se o diluidor à base de Tris-gema de ovo, que tem mostrado melhor capacidade de manter a viabilidade espermática (ROTA *et al.*, 1995) e o diluidor à base de água de coco, este último, amplamente utilizado na espécie caprina e ovina (RODRIGUES *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 1994) e também já utilizado com sucesso na espécie canina (CARDOSO *et al.*, 2005).

A água de coco é uma solução estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e diversos eletrólitos, fornecendo os nutrientes necessários para conservação das células espermáticas. Depois de corrigidos a osmolaridade e o pH para o sêmen da espécie respectiva, a água de coco *in natura* poderia representar um meio diluidor eficiente, e ainda com uma relação custo-benefício favorável aos programas de I.A no Brasil, pois, não haveria custos adicionais com diluidores importados (NUNES e COBARNOUS, 1995). Tendo em vista que, é uma fruta abundante no território brasileiro.

2.6 AGENTES CRIOPROTETORES DO SÊMEN

As substâncias crioprotetoras são divididas em permeáveis ou intracelulares e impermeáveis ou extracelulares de acordo com o peso molecular e a conseqüente propriedade de atravessar ou não a membrana celular (SILVA, 2007).

Os crioprotetores são componentes essenciais dos meios diluidores para congelação e, dependendo da sua capacidade de atravessar as membranas espermáticas, são classificados como penetrantes e não penetrantes (AMANN e PICKETT, 1987).

Os crioprotetores permeáveis mais utilizados são o glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido (DMSO); essenciais para minimizar ou prevenir a formação de cristais de gelo intracelular. Os crioprotetores impermeáveis, como a sacarose lipoproteínas da gema do ovo e proteínas do leite, por outro lado, auxiliam na estabilização da membrana plasmática durante o processo de congelação/descongelação (SILVA, 2007).

A adição de crioprotetores melhora a sobrevivência celular após os processos de congelação e descongelação. Os agentes crioprotetores pertencem a dois grupos (SILVA, 2007):

- 1) aqueles que penetram nas células, como o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o etileno-glicol e o metanol;

- 2) aqueles que permanecem no meio extracelular, como as proteínas, os açúcares e o polivinil-pirrolidona.

Os agentes crioprotetores penetrantes, particularmente o glicerol, protegem a célula da crioinjúria durante a fase de cristalização. Dessa forma, não pareceria ser lógico adicionar o glicerol a temperaturas superiores a 30°C. Porém, já foi demonstrado que o glicerol poderia ser adicionado ao sêmen canino a 37 °C, a 27° C ou a 4°C. Esta adição poderia ser realizada quer seja na forma única ou fracionada, sendo a adição única mais indicada por conferir mais praticidade ao processo. (SILVA, 2007)

O glicerol é o crioprotetor mais empregado na congelação de sêmen nas diferentes espécies (SILVA *et al.*, 2003). Este crioprotetor, inicialmente, ocasiona um estresse osmótico ao espermatozóide, impedindo a formação de grandes cristais de gelo intracelulares. Tal qual em outras espécies, a ausência de glicerol durante a criopreservação do sêmen canino resulta em uma redução na sobrevivência espermática após a descongelação, apresentando valores que variam de 11% a 20% (SILVA, 2007) de motilidade espermática após a descongelação.

Segundo Silva (2007) estes reportaram que o glicerol exerce efeitos tóxicos sobre os espermatozóides, como alterações físico-químicas que podem levar à ruptura da membrana plasmática, à remoção de importantes proteínas membranárias, ou originar danos acrossomais.

A concentração ideal de glicerol no diluente seria aquela em que há uma predominância de seus efeitos protetores sobre os efeitos tóxicos. Essa concentração pode ser influenciada por outros componentes do diluente, pelo padrão de resfriamento, pelos métodos de congelação e descongelação, e pelas características seminais de cada espécie (SILVA, 2007).

Os crioprotetores não penetrantes como a lactose e lipoproteínas da gema do ovo atuam somente no compartimento extracelular, desidratando o espermatozóide, reduzindo assim, a probabilidade de formação de grandes cristais de gelo dentro da célula (GRAHAM, 1996).

Alternativamente ao glicerol, outros crioprotetores foram também testados para a criopreservação do sêmen de cães. Demonstraram que a incorporação do dimetil-sulfóxido isoladamente ou em associação com o glicerol, aos diluentes à base de TRIS ou lactose, não melhora as taxas de motilidade e sobrevivência espermática após a descongelação, quando comparado ao glicerol. Investigou-se o uso do metanol como crioprotetor para o sêmen de cães e obtiveram uma taxa de concepção de 42,8% após inseminação artificial utilizando esse meio (SILVA, 2007).

2.7 FONTE DE ENERGIA

A maioria dos extensores utilizados na criopreservação do sêmen canino contém glicose ou frutose. Investigações iniciais do metabolismo energético do sêmen fresco de cães incubados em glicose 10mM ou frutose indicou que a frutose é mais eficiente que a glicose na obtenção de níveis energéticos. Além disso, existem indicações que a frutose possivelmente tenha uma relação como um fator ativador do espermatozóide após a ejaculação (SILVA, 2007).

2.8 ANTIBIÓTICOS

Os ejaculados são estéreis, mas sua contaminação a partir do prepúcio, uretra e pênis, são inevitáveis durante o processo de coleta. Essa contaminação pode ser menor com o uso de técnicas assépticas e medidas de higiene antes e durante a coleta. A contaminação bacteriana pode afetar negativamente a fertilidade, pela própria presença de bactérias, pela produção de toxinas, por degradação dos componentes do meio, ou ainda, pela utilização de substratos metabólicos. Essa situação determina a necessidade de incorporar aos diluentes substâncias de efeito antimicrobiano (SILVA, 2007).

A associação clássica de Penicilina e Estreptomicina resulta numa preparação antibiótica eficaz e possivelmente a mais utilizada na elaboração de diluentes seminais (SILVA, 2007).

2.9 RESFRIAMENTO

Para o resfriamento, o sêmen pode ser colocado em geladeira convencional, mas deve sempre ser acondicionado em um recipiente fechado e mantido à temperatura de 37° C para evitar queda de temperatura muito rápida. Outra forma de resfriamento do sêmen é por meio do uso de um recipiente com gelo, porém, deve-se evitar o contato direto do gelo com o recipiente de sêmen (LINDE-FORSBERG, 1989).

Poucos experimentos sobre criopreservação do sêmen canino relataram o procedimento utilizado para o resfriamento. A maioria deles limitou-se em descrever somente o tempo de resfriamento e de equilíbrio e as temperaturas iniciais e finais aplicadas (ENGLAND & PONZIO, 1996).

As primeiras mudanças na temperatura durante a refrigeração são conhecidas por alterar as propriedades físicas de todas as membranas celulares. Embora, ainda não totalmente esclarecido, há um rearranjo na relação lipídio-proteína resultando na perda da permeabilidade seletiva que é uma característica das membranas biológicas (SILVA, 2007).

A prevenção dessa alteração entre os lipídios e proteínas por taxas de refrigeração mais lenta ou diluição das células espermáticas de meios extensores podem ser infecundas. Há ainda a possibilidade de elementos do citoesqueleto das células serem sensíveis a fusão desorganizada das membranas celulares, seguindo a criopreservação (SILVA, 2007).

2.10 CONGELAMENTO

A taxa de congelação usada na criopreservação do sêmen canino varia amplamente, e são dependentes do método de envasamento. A congelação pode cessar algumas reações bioquímicas e acelerar outras (SILVA, 2007).

O processo de criopreservação representa uma interrupção artificial do progresso de maturação do espermatozóide pós-ejaculação e na fertilização. O maior problema com relação à criopreservação de sêmen é que mesmo utilizando as melhores técnicas, o padrão de sobrevivência pós-descongelação é restrito em cerca de 50% da população espermática (WATSON, 1995).

Desde que o crioprotetor é adicionado e equilibrado o sêmen diluído é envasado (pellets, palhetas) e a congelação se inicia. As taxas de congelação variam na dependência da espécie e do método de envase. A congelação se inicia e a temperatura diminui para -5 a -15°C , que é correspondente ao super resfriamento, definido quando tem início a formação de cristais de gelo na solução ao redor das células, enquanto os componentes celulares permanecem descongelados (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990).

A água super resfriada dentro da célula, devido a uma diferença no potencial químico, com água extracelular, favorece a saída de água de dentro da célula que se congela externamente (MAZUR, 1984). Como as temperaturas continuam a diminuir e a água extracelular já se encontra congelada, a célula é então exposta à condição hipertônica e a alta concentração de sal extracelular, causando ainda mais a saída de

água. Movimentos de água para fora da célula diminuem a possibilidade de formação de cristais de gelo dentro da célula. Portanto, a taxa de congelação torna-se importante no controle da formação de cristais de gelo intracelular.

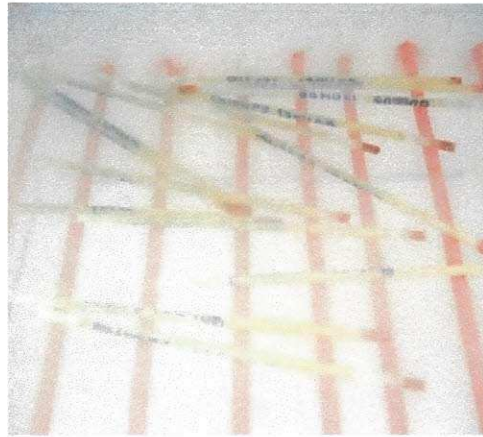


Figura 04. Palhetas contendo sêmen congelado.
(Fonte: <http://www.webanimal.com.br/cao>)

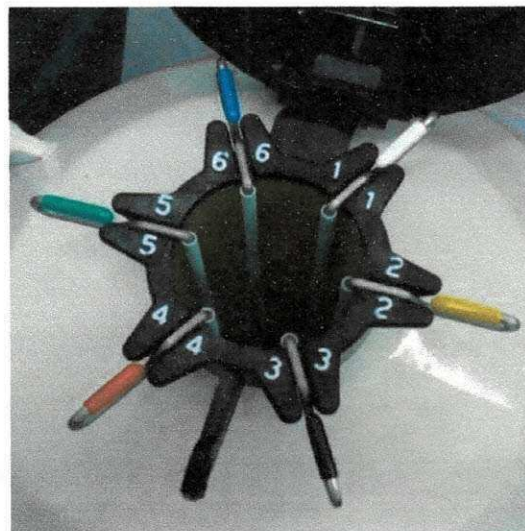


Figura 05. Botijão de nitrogênio onde o sêmen congelado é armazenado.
(Fonte: <http://www.webanimal.com.br/cao>)

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É realidade que as técnicas de reprodução artificiais vêm se desenvolvendo de forma mais lenta nos cães, a despeito da utilização da espécie como modelo experimental, do que nos animais de produção. Isto se deve, além de outras considerações, a particularidades da biologia reprodutiva da espécie canina, que dificulta e inviabiliza a transposição de conceitos e técnicas utilizadas nas outras espécies domésticas.

O congelamento ou resfriamento de sêmen e a sua utilização tropeçam em detalhes inerentes à espécie canina, por exemplo: baixa viabilidade espermática pós-descongelamento/pós-resfriamento, identificação do momento ideal da ovulação nas fêmeas e técnicas de I.A intra-uterina utilizadas. Esses fatores são provavelmente as causas que se pode explicar a pouca difusão dessa biotecnica na espécie canina.

Porém, hoje em dia existem muitos trabalhos que estão sendo realizados, levando em conta as necessidades da célula espermática canina, estimulando assim o aprimoramento de tecnologias de sêmen canino.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.
- ANDERSEN K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. **Zuchtygiene**, v.10,p.1-4, 1975.
- BARDER, H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. **J. Reprod. Fertil.**, v.32, p.59-64, 1982.
- BARTLETT, D.J. Studies on dog sêmen. Morphological characteristics. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, v.3, P. 173-189, 1962.
- BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D. Effect of storage temperatures, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. **Theriog.**, v. 34, n.1, p.147-157, Missouri, 1990.
- BRACKETT, B.G.; WILLIAMS, W.L. ATP content of spermatozoa, semen and seminal plasma. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, (s.l.), v. 125, p.1135-1136, 1967.
- BRACKETT, B.G.; WILLIAMS, W.L. ATP content of spermatozoa, semen and seminal plasma. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, (s.l.), v. 125, p.1135-1136, 1967.
- CARDOSO, R.C.S; SILVA, A.R; SILVA, L.DM. Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Ciência Rural, Santa Maria**. v.30, n.6, p.1021-1025, 2000. 2005.
- CHISTIANSSEN, I.J; SCHMIDT, M. deep freezing of dog sêmen: Preliminary report. **Kongelige Veterinaerog Landbohojskole, Sterilitestesfarking**, v.23, n. 67, p. 69-75, 1988.
- CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. IN: **KIRK. Current veterinary therapy – Small animal practice**. Philadelphia, Saunders. p.1247-1289, 1989.
- ENGLAND, G.C.W. Criopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility. Suppl.**, v.47, p.243-255, 1993.
- ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II: Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, 37, 373 – 381. 1992.
- ENGLAND, G.C.W., PLUMMER, J.M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, 47, 261 – 270. 1993.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. An investigation into the origin of the first fraction of canine ejaculate. **Rev. Vet. Sci.**, v. 49, p. 66-70, (s.l.), 1990.

ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v. 46, n. 1, p.165-171, London, 1996.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v. 23, p. 1-13, 1986.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. Canine and feline endocrinology and reproduction. **W. B. Saunders Company** (Philadelphia). 1996.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. Canine and feline endocrinology and reproduction. Second edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 785p., 1996.

FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog semen. **American Journal of Veterinary Research**, v.25, n.104, p.37-40, 1964.

GOODWIN, M., GOODING, K.M., REGNIER, F.; Sex pheromone in the dog. **Science**, 203: 559-561. 1979.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-47, 1996.

GÜNZEL, A.R. Zur Spermagewinnung, -beurteilung und -konservierung sowie Samenübertragung beim Hund. **Tierärztl. Prax.**, Hannover, v. 14, n. 2, p. 272-288, 1986.

GÜNZEL-APEL, A.R.; KRAUSE, D. Laufigkeitsüberwachung und Samenübertragung beim Hund. **Hannover Tierärztliche Hochschule, Umschau**, v.8, p.564-570, 1986.

GÜNZEL-APEL, A.R.; EKROD, B. Einflüsse von Prostatasekret und Verdünner auf die Spermienmotilität und ATP- Konzentration sowie die Aktivität der sauren und alkalischen Phosphatase von Beagle-Samen., **Reprod. in Dom. An.**, v. 26, n.1, p.31-41, Hannover, Alemanha, 1991.

HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **J. Androl.**, v.11, p.73-88, 1990.

HUNTER, R.H.F. Factors influencing Sperm Migration in the fallopian tubes. **Reprod. Dom. Anim.**, v.34, p.227-35, 1999.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *In: CONGRESSO DE MEDICINA EQUINA*, 1, Jaboticabal, SP, 1994. **Anais**. Jaboticabal, p. 156-165. 1994.

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

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. **Vet Clin North Am**,v.21, p.467-485, 1991.

LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to sêmen quality and the time and site of iseminatio with fresh and frozen semen.**J. Reprod. Fertil.**, v.39, p.299-310, 1989.

MAHI. C.A.; YANAGIMACHI, R. Capacitation, acrossome reaction and egg penetration by canine spermatozoa in a simple define medium. **Gam. Res.**, (s.l.), v .1, p. 101-109, 1978.

MAZUR, P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. **Am. J. Physiol.**, v.247, p. C125-42, 1984.

MESSIAS, C., Algumas características do sêmen do cão após diluição do cão após diluição e resfriamento. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná; p. 2-8, 2000.

MIES FILHO, A. Inseminação Artificial. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 750p.,1987.

MULTAMÄKI , S.J.; SUOMINEN, J.J.O.; DJUPSUND, B.M. Improvement of spermatozoal motility characteristics. **Arch. of Andr.**, (s.l.),v. 4, p.125- 132, 1980.

NOTHLING, J.O; GERSTENBERG, C.; VOLKMANN, D.H. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen – A retrospective study. **J. of South Afr. Vet. Assoc.**, v. 66, n. 2, p. 49-55, Pretoria, 1995.

NUNES, J.F.; COBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor de sêmen dos mamíferos domésticos. **Ciência Animal**, v.5, n.1-2, p.15-21,1995.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-22, 1992.

QUINN, P.J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. **Cryobiology**, v. 22, p. 128-46, 1985.

ROTA. A.; STROM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. **Theriogenology**, v. 44, p.665-900, 1995.

SILVA et al., 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. Atualidades sobre criopreservação do sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.119-127, jan./mar.2007.

SILVA, A.R; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C; SILVA, L.D.M. Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, 59: 821-829, 2003.

SILVA, A.R; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, DC; SILVA L.D.M. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **Veterinary Journal**, v.164, p. 2444-2446, 2002.

SILVA, AR; CARDOSO R.C.S; SILVA, L.D.M. Comparison between powder coconut water (PCW 106®) and tris buffer as extenders for canine semen cryopreservation. In: **5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, 2004 Anais...** Embu das Artes. SP, Brazil. Pp.98-99, 2004.

SILVA, L.D.M. Avanços da inseminação artificial na espécie canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 25 (2), 107-111. 2001.

SIRIVAIDYANPONG et al., Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. **Theriogenology**, v.53, p.789-802, 2000.

SMITH, E.R. The canine prostate and its secretion. **Adv. Sex. Horm. Res.**, (s.l.), v. 1, p. 167-204, 1975.

SOUZA, N.M., TEIXEIRA, M.D.A., OLIVEIRA, L.F. *et al.* Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidores do semen ovino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Olinda-Pe. **Anais...** Olinda-PE. Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p.583-656p. 1994.

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

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 29, n.5, p. 1043-54, 1998.