

## CONSERVAÇÃO DO SÊMEN CANINO SOB REFRIGERAÇÃO EM DIFERENTES CAIXAS ISOTÉRMICAS

[Canine semen conservation under cooling in different isothermal boxes]

Antonio Cavalcante Mota-Filho<sup>1</sup>, Thibério Souza Castelo<sup>1</sup>, Leonardo Lelis de Macedo Costa<sup>1</sup>, Gabriela Liberalino Lima<sup>1</sup>, Alexandre Rodrigues Silva<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Animais, UFERSA, Mossoró, RN.

**RESUMO** - O presente estudo objetivou determinar o período máximo de conservação em diferentes caixas isotérmicas sobre a viabilidade do sêmen canino refrigerado. O sêmen de oito cães foi coletado por manipulação digital. A fração espermática foi avaliada quanto ao volume, coloração, motilidade, vigor, morfologia espermática, integridade acrossomal, resposta osmótica e concentração espermática. Em seguida, foi diluída em Leite UHT desnatado acrescido de 20% de gema de ovo e dividida em alíquotas, que foram armazenadas em caixas isotérmicas de poliestireno expandido de 3L ou 5L, contendo gelo biológico. As referidas caixas foram abertas após 12h, 18h, 24h e 30h de armazenagem. Nessa ocasião, o sêmen foi reavaliado quanto às características já citadas. A temperatura interna das caixas e a temperatura ambiente foram monitoradas. Como principais resultados, a motilidade espermática progressiva foi conservada de maneira aceitável até as 30 horas em ambas as caixas, as quais não apresentaram diferenças quanto à conservação de nenhuma das características seminais ( $P > 0,05$ ). Porém, a temperatura interna da caixa de 3L apresentou uma elevação significativa a partir das 18h ( $P < 0,05$ ), sendo que na caixa de 5L, a temperatura interna manteve-se constante por todo o experimento. Conclui-se que o sêmen canino diluído em leite UHT desnatado pode ser eficientemente conservado por até 30h em caixas isotérmicas de 3L ou 5L, contendo gelo reciclável. Mas salienta-se que a caixa de 5L apresenta maior segurança para a viabilidade espermática, pois é mais eficiente na manutenção de uma temperatura constante.

**Palavras-Chave:** Sêmen, cão, refrigeração.

**ABSTRACT** - The aim of this study was to determine the maximum time of conservation in different isothermal boxes of the diluted canine semen under cooling. Semen from eight dogs was collected by digital manipulation. The sperm fraction was evaluated for volume, color, motility, vigor, sperm morphology, acrossomal integrity, osmotic answer and sperm concentration. Then, it was diluted in skimmed UHT milk plus egg yolk (20%) and divided in samples, which were stored in 3L or 5L expanded polystyrene isothermal boxes, containing recyclable ice. These boxes were open after 12h, 18h, 24h and 30h of storage and semen was reevaluated for the characteristics already mentioned. The temperature into the boxes and the environmental temperature were monitored. As main results, the progressive sperm motility was acceptably conserved up to 30h in both boxes, which did not present differences in the conservation of none of the seminal characteristics ( $P > 0.05$ ). However, the temperature into the 3L-box showed a significant elevation starting from the 18h ( $P < 0.05$ ), and the temperature into the 5L-box remained constant for whole the experiment. It is concluded that the canine semen diluted in skimmed UHT milk can be efficiently conserved for up to 30h in 3L or 5L isothermal boxes, containing recyclable ice. But it is pointed out that the 5L-box presents larger safety for the sperm viability, because it is more efficient in the maintenance of a constant temperature.

**Keywords:** Semen, dog, cooling.

\* Autor para correspondência. DCAN – UFERSA, BR. 110, Km.47, Costa e Silva, 59625-900, Mossoró – RN, Brasil. E-mail: legio2000@yahoo.com.

## INTRODUÇÃO

A partir da descoberta da ação conservativa do frio sobre o metabolismo espermático por Spallazani em 1776, diversos avanços têm sido descritos na tecnologia de sêmen (Yoshida, 2000). Em 1956, Harrop foi o primeiro a descrever a obtenção de crias viáveis oriundas de inseminação artificial após o transporte intercontinental do sêmen canino refrigerado e diluído em leite. Desde então, o transporte de sêmen vem sendo realizado constantemente entre e dentro dos países. Porém, os imprevistos de viagens muitas vezes fazem com que a viabilidade espermática seja comprometida (Nagao et al., 2007). Desse modo, é contínua a tentativa dos pesquisadores de incrementar metodologias para conservação do sêmen, garantindo boa funcionalidade espermática por períodos longos.

A conservação do sêmen canino em baixas temperaturas tem sido realizada em salas climatizadas (Iguer-Ouada & Verstegen, 2001; Verstegen et al., 2005), refrigeradores convencionais (Rota et al., 1999; Strom-Holst et al., 2000; Ponglowhapan et al., 2004), garrafas térmicas (Pinto et al., 1999), recipientes térmicos comerciais (Lane STS System®, Estados Unidos - Pinto et al., 1999; Botu-Tainer®, Brasil - Nagao et al., 2007), e caixas isotérmicas de poliestireno expandido (Silva et al., 2004). Estas últimas têm sido utilizadas amplamente como uma alternativa viável e de baixo custo para a conservação visando o transporte do sêmen canino. Entretanto, tal utilização tem sido realizada de forma empírica, onde são utilizadas tanto as caixas de 3 L (Silva et al., 2004), quanto as caixas de 5 L (Uchoa et al., 2007), com diferentes proporções de gelo reciclável em seu interior. Ressalta-se que estudos sistemáticos objetivando a determinação do período máximo de conservação em ambos os recipientes ainda não foram conduzidos.

A aquisição de informações acerca da longevidade espermática em caixas isotérmicas pode permitir uma programação confiável para o envio de amostras de sêmen entre regiões distantes, evitando perdas de qualidade do material caso seja ultrapassado um determinado limiar de tempo. Assim, o presente estudo objetivou determinar o período máximo de conservação da viabilidade do sêmen canino diluído e refrigerado em diferentes caixas isotérmicas de poliestireno expandido.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se os ejaculados de oito cães da raça American Pit Bull Terrier, com idade entre 12 e 24

meses, oriundos de canis particulares localizados na cidade de Mossoró-RN. Os animais foram alimentados com ração comercial peletizada uma vez ao dia, tendo livre acesso à água.

Cada animal foi submetido a uma coleta de sêmen por manipulação digital do bulbo peniano, na ausência de fêmea em estro, restando-se a fração espermática para uso no experimento. Após a coleta, foi feita a avaliação do sêmen (Johnston et al., 2001), observando-se o volume e coloração da amostra. A motilidade progressiva (%) foi avaliada por microscopia de luz (400x). Apenas as amostras que apresentaram motilidade progressiva  $\geq 80\%$  foram utilizadas nos experimentos. Para cada animal, um esfregaço de sêmen foi confeccionado e corado com Rosa de Bengala para avaliação das alterações morfológicas e da integridade acrossomal, sendo contadas 200 células sob microscopia de luz (1000x). A concentração espermática foi determinada, utilizando-se um hemocítmetro.

Para avaliação da função de membrana dos espermatozoides, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de cada ejaculado foi incubada a 38°C em 90  $\mu\text{L}$  de água destilada (osmolaridade 0 mOsm/L). Após 30 minutos, procedeu-se avaliação sob microscopia (400x), sendo contadas 200 células. As células espermáticas que apresentavam resposta osmótica típica, representada pelo encurvamento e edemaciação da cauda, foram consideradas como portadoras de uma membrana plasmática funcional (Quintela et al., 2004).

A fração espermática dos ejaculados foi então diluída na proporção de uma parte de sêmen para duas partes (1:2) de diluente. Foi utilizado como diluente o leite UHT desnatado (Betania®) acrescido de 20% de gema de ovo de galinha, 1000UI de penicilina/mL e 10%g de estreptomicina/mL de diluente (Romagnoli, 2002).

Após a diluição, as amostras foram divididas em alíquotas de 200 $\mu\text{L}$ , mantidas em tubos plásticos individuais revestidos por papel alumínio, e acondicionadas em caixas isotérmicas de poliestireno expandido (Isoplast®, Fortaleza, Brasil) de 3L (19 x 11 x 14cm) contendo uma unidade de gelo reciclável (Mota-Filho et al., 2007) ou 5L (15 x 21 x 17cm) contendo três unidades de gelo reciclável (Uchoa et al., 2007). Cada caixa apresentava 1,5 cm de espessura em sua parede. Cada unidade de gelo reciclável (Gelo eutético®, Campinas, Brasil) apresentava as seguintes dimensões: 18 x 9,5 x 6,4 cm, com volume de 1L. Foram utilizadas quatro caixas de 3L e quatro de 5L, enumeradas de 01 a 04. As alíquotas de sêmen contidas nas caixas de

número 01 foram analisadas 12h após o acondicionamento. As demais alíquotas foram avaliadas às 18h, 24h e 30h após o armazenamento com relação às mesmas características já citadas para o sêmen fresco. A temperatura interna das caixas e a temperatura ambiente foram mensuradas através de termômetros digitais (Digi09 –Mercúrio®), dotados de um sensor externo colocado no interior das caixas.

Foram realizadas oito repetições para cada tratamento. Os resultados foram expressos na forma de média e desvio padrão. Os dados percentuais referentes à motilidade progressiva, morfologia espermática, integridade acrossomal e resposta osmótica, foram submetidos à transformação em ArcoSeno e expressos em graus. As análises dos resultados concernentes às características seminais foram realizadas através da ANOVA, utilizando o modelo GLM (General Linear Model) do programa estatístico Statview 5.0 (SAS Institute Inc., 1998). Em seguida, comparações entre as caixas de isopor, com relação à motilidade espermática, resposta osmótica, morfologia espermática e integridade acrossomal foram realizadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Diferenças entre as duas caixas no tocante à temperatura interna e em relação à temperatura ambiente foram avaliadas pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen fresco dos animais utilizados neste experimento apresentou coloração branco opalescente, volume de  $0,8 \pm 0,2$  mL e concentração espermática  $595,7 \pm 129,3$  espermatozoides/mL. Verificou-se a presença de  $96,9 \pm 5,3\%$  de espermatozoides com motilidade progressiva, sendo observados  $85,2 \pm 5,1\%$  de células morfológicamente normais, com  $98,3 \pm 2,2\%$  de acrossomas íntegros e  $94,1 \pm 3,0\%$  de células com membranas funcionais. Essas características mostram que o sêmen fresco estava dentro da normalidade para a espécie canina (Johnston et al., 2001).

Os dados referentes à avaliação da motilidade progressiva em ambas as caixas de isopor testadas estão expressos na Tabela 1. Não foram evidenciadas diferenças entre as duas caixas no que se refere à conservação da motilidade espermática em nenhum dos momentos de avaliação ( $P > 0,05$ ). Porém, foi observado um declínio gradual deste parâmetro em ambos os grupos no decorrer de cada avaliação ( $P < 0,05$ ). Os valores obtidos possibilitam a realização de inseminações artificiais no uso do sêmen canino conservado por até 30h em ambas as

caixas, pois segundo Concannon & Battista (1989), o valor ideal mínimo para a realização das inseminações é de 50% de espermatozoides com motilidade progressiva. Além disso, estes resultados são superiores aos descritos por Cardoso et al. (2007), que conservaram a motilidade espermática no sêmen canino refrigerado diluído em leite-gema dentro do aceitável por apenas 24h.

**Tabela 1** – Motilidade progressiva (%) no sêmen canino fresco e diluído em Leite UHT, após conservação em caixas térmicas de isopor de 3L ou 5L por até 30h.

|               | Caixa de 3L          | Caixa de 5L          |
|---------------|----------------------|----------------------|
| Sêmen fresco  | $96,9 \pm 5,3^{aA}$  | $96,9 \pm 5,3^{aA}$  |
| Sêmen diluído | $96,3 \pm 5,2^{aA}$  | $96,3 \pm 5,2^{aA}$  |
| 12h           | $85,6 \pm 6,8^{aB}$  | $87,5 \pm 9,6^{aB}$  |
| 18h           | $77,5 \pm 8,5^{aC}$  | $80,0 \pm 11,0^{aC}$ |
| 24h           | $70,0 \pm 4,6^{aD}$  | $73,8 \pm 8,4^{aD}$  |
| 30h           | $55,0 \pm 10,7^{aE}$ | $63,8 \pm 7,4^{aE}$  |

<sup>a</sup> Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não houve diferença estatística entre as caixas ( $P > 0,05$ ).

<sup>A,B,C,D,E</sup> Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre avaliações no decorrer do tempo ( $P < 0,05$ ).

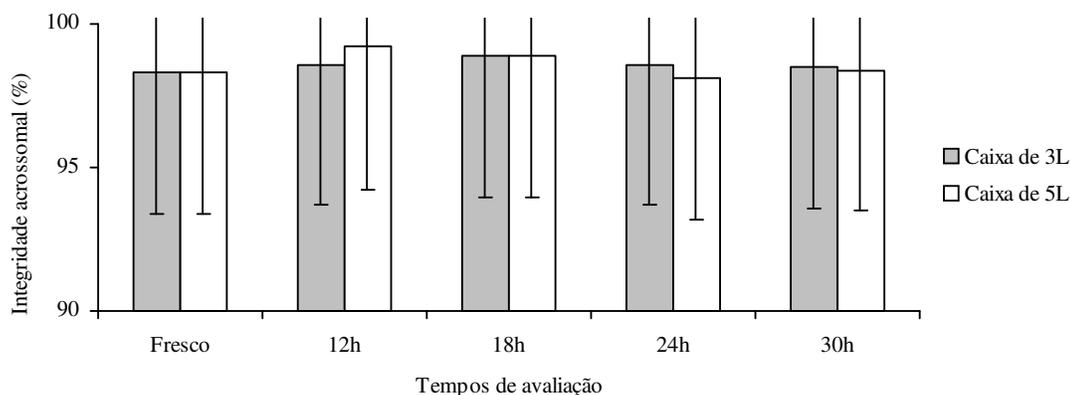
Segundo se verifica na Tabela 2, as caixas de 3L e 5L foram similares na conservação da morfologia espermática no decorrer de todo o experimento ( $P > 0,05$ ), tendo sido observados valores acima de 80% de espermatozoides morfológicamente normais em todas as avaliações. Estes resultados comprovam a eficiência das caixas de isopor na conservação desta característica espermática, pois a fertilidade em cães só seria afetada caso amostras de sêmen com menos de 60% de espermatozoides normais fossem utilizadas em inseminações artificiais (Oettlé, 1993). Além disso, neste estudo, a maioria das alterações encontradas foram classificadas como secundárias, as quais, segundo Cardoso et al. (2007), têm pouca interferência sobre a fertilidade, quando comparadas às primárias. Porém, é importante enfatizar que a microscopia de luz não permite a visualização de danos na ultra-estrutura espermática, sendo sugestivo o emprego de outras técnicas como a microscopia eletrônica (Silva et al., 2006).

A Figura 1 mostra que não existiram diferenças entre as duas caixas no decorrer das avaliações quanto à preservação da integridade acrossomal das células espermáticas ( $P > 0,05$ ), e que ambas mantiveram a integridade acrossomal em valores superiores a 90%. Conforme demonstrado por Cardoso et al. (2007), a integridade acrossomal está diretamente relacionada à taxa de interação entre espermatozoides e oócitos, na espécie canina.

**Tabela 2** – Morfologia espermática (%) no sêmen canino fresco e diluído em Leite UHT, após conservação em caixas térmicas de isopor de 3L ou 5L por até 30h.

| Avaliações   | Caixas | Normais    | Alterações |             |            |
|--------------|--------|------------|------------|-------------|------------|
|              |        |            | Primárias  | Secundárias | Totais     |
| Sêmen fresco |        | 85,2 ± 5,1 | 2,5 ± 2,2  | 12,3 ± 3,7  | 14,8 ± 5,1 |
| 12h          | 3L     | 82,0 ± 6,3 | 2,9 ± 1,7  | 15,1 ± 5,8  | 18,0 ± 6,3 |
|              | 5L     | 82,8 ± 9,0 | 1,4 ± 1,7  | 15,9 ± 7,6  | 17,3 ± 9,0 |
| 18h          | 3L     | 84,4 ± 5,9 | 2,2 ± 1,5  | 13,5 ± 6,0  | 15,6 ± 6,9 |
|              | 5L     | 82,9 ± 8,0 | 1,5 ± 1,4  | 15,6 ± 6,7  | 17,1 ± 8,0 |
| 24h          | 3L     | 83,5 ± 3,6 | 2,5 ± 1,7  | 14,1 ± 3,8  | 16,5 ± 3,6 |
|              | 5L     | 83,7 ± 5,2 | 2,8 ± 2,0  | 13,5 ± 4,4  | 16,4 ± 5,2 |
| 30h          | 3L     | 83,6 ± 6,7 | 2,5 ± 2,4  | 14,1 ± 6,4  | 16,4 ± 6,7 |
|              | 5L     | 84,5 ± 5,4 | 3,4 ± 2,3  | 12,1 ± 5,5  | 15,5 ± 5,3 |

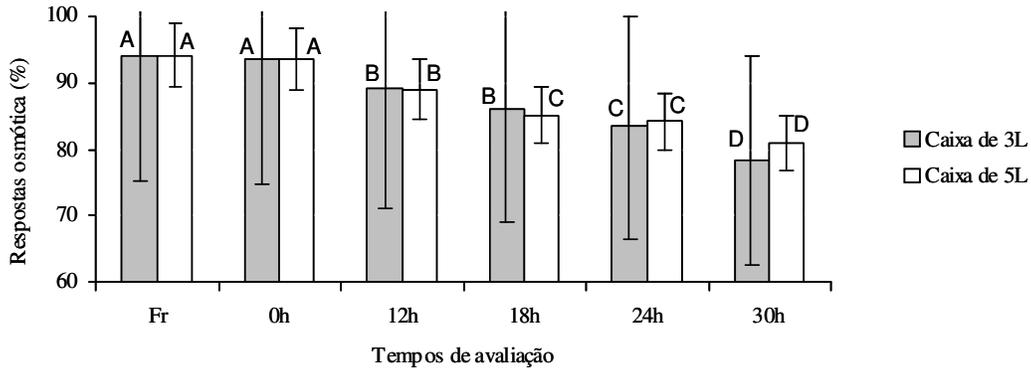
Não foram evidenciadas diferenças entre grupos ou entre avaliações -  $P > 0,05$ .

**Figura 1** – Integridade acrossomal (%) no sêmen canino fresco e diluído em Leite UHT, após conservação em caixas térmicas de isopor de 3L e 5L por até 30h ( $P > 0,05$ ).

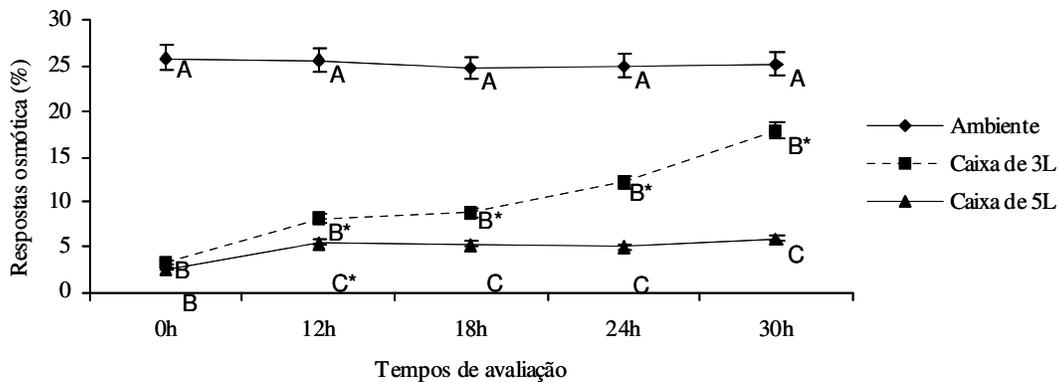
O teste hiposmótico é utilizado na avaliação da função de membrana plasmática de espermatozoides (Inamassu et al., 1999). Esta estrutura está diretamente envolvida no processo de fusão da célula espermática com o oócito (Curry e Watson, 1995). Conforme se observa na Figura 2, não foram evidenciadas diferenças entre as duas caixas com relação à resposta osmótica das células espermáticas ( $P > 0,05$ ), existindo, no entanto, um declínio gradativo significativo da função de membrana das células no decorrer dos tempos de avaliação ( $P < 0,05$ ). Esses resultados são similares aos reportados por Inamassu et al. (1999), que sugerem que o edema das células espermáticas é indicativo da integridade e da função das membranas espermáticas, enquanto a motilidade depende não somente do transporte de substâncias que atravessam as membranas, mas também de um grande número de outras funções bioquímicas, como o metabolismo

e a ação microtubular das fibras da região da cauda dos espermatozoides.

Em adição, a caixa térmica de 5L foi mais eficiente na manutenção de uma temperatura constante no decorrer de todo o período do experimento, quando comparada à caixa de 3L (Figura 3). Salienta-se que a temperatura ambiente foi controlada e mantida constante neste experimento. É provável que em condições reais de transporte de sêmen existam variações na temperatura ambiente, o que poderia afetar negativamente a temperatura interna de ambas as caixas. Entretanto, acredita-se que a caixa de 3L sofra uma maior influência dessa possível oscilação na temperatura ambiente e isso venha a contribuir negativamente na manutenção da qualidade espermática, podendo favorecer alterações no pH e o crescimento bacteriano. Estes resultados assemelham-se àqueles demonstrados por Nunes et



**Figura 2** – Resposta osmótica (%) do sêmen canino diluído em Leite UHT, após conservação em caixas térmicas de isopor de 3L ou 5L por até 30h. Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito do tempo sobre o mesmo grupo -  $P < 0,05$ . Não foram evidenciadas diferenças entre grupos na mesma avaliação -  $P > 0,05$ .



**Figura 3** – Temperatura ambiente e temperatura interna das caixas térmicas de isopor de 3L ou 5L durante a conservação de sêmen canino por até 30h. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre temperaturas no mesmo tempo de avaliação -  $P < 0,05$ ; \* indica elevação de temperatura em relação ao tempo de avaliação -  $P < 0,05$ .

al. (2007), que afirmam que o uso de caixas isotérmicas de maiores dimensões, contendo maiores quantidades de gelo biológico, permitem a manutenção adequada da temperatura por um maior período e conferem maior segurança à preservação da qualidade espermática no sêmen de garanhões.

### CONCLUSÕES

Diante do exposto, pode-se concluir que o sêmen canino diluído em leite UHT desnatado pode ser eficientemente conservado por até 30h em caixas

isotérmicas de poliestireno expandido de três ou cinco litros, contendo gelo reciclável. Mas salienta-se que a caixa de 5L apresenta maior segurança para a viabilidade espermática, pois é mais eficiente na manutenção de uma temperatura constante.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica (PIBIC) para os alunos Antonio C. Mota-Filho e Thibério S. Castelo; agradecem também ao Prof. Dr. Benito S. Blanco,

por ter cedido as instalações do Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da UFERSA para a realização do experimento.

## REFERÊNCIAS

- Banks W.J. 1991. *Histologia Veterinária Aplicada*, 2 ed. Manole, São Paulo.
- Cardoso, P.B.S., Crusco, S.E., Rodrigues, M.P., Nichi, M., Goes, P.A.A. & Barnabe, V.H. 2007. Avaliação da viabilidade espermática in vitro do sêmen canino no diluidor gema de ovo-leite desnatado refrigerado a 5°C por 48 horas. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Anais... Curitiba: CBRA, p.170.
- Cardoso, R.C.S., Silva, A.R., Silva, L.D.M., Chirinéa, V.H., Souza, F.F., & Lopes, M.D. 2007. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106® using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. *Reprod. Dom. Anim.* 42:11-16.
- Concannon, P.W. & Battista, M. 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk R.W. (Ed), *Current veterinary therapy*. Philadelphia: WB Saunders, p. 1247-1259.
- Curry, M.R. & Watson, P.F. 1995. Sperm structure and function. In: Grudzinskas, J.G., Yovich, J.L. (Eds.). *Gametes – The spermatozoon*. Cambridge: Cambridge University Press, p.45-60.
- Harrop, A.E. 1956. Artificial insemination in dogs – the first transatlantic conception. *Brit. Vet. J.* 112: 338-340.
- Iguer-Ouada, M. & Verstegen, J.P. 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55:671-684.
- Inamassu, A., Uechi, E. & Lopes M.D. 1999. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 23:302-304.
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R. & Olson, P. N. S. 2001. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: W.B.Saunders, 592p.
- Mota-Filho, A. C., Nascimento, M. V., Silva, A. R. Conservação do sêmen canino em caixas de isopor utilizando diluentes à base de Tris ou leite UHT desnatado. In: Feira de Ciência, Inovação, Cultura e Tecnologia do Estado do Ceará, 3, 2007. Anais... Fortaleza: UECE, 2007, p.1.
- Nagao, J.F., Martins, M.I.M., Padilha, L.C. & Savi, P.A.P. 2007. Características morfofuncionais de espermatozoides caninos mantidos em “containers” para transporte refrigerado de sêmen, utilizando o diluente “Botu-Sêmen®”. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Anais... Curitiba: CBRA, p.186.
- Nunes, D.B., Zorzatto, J.R., Costa E Silva, E.V., Zúccari, C.E. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. *Animal Reproduction Science*, 2007, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.022
- Oettlé, E.E. 1993. Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil.*, 47: 257-260.
- Pinto, C.R.F., Paccamonti, D.L. & Eilts, B.E. 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, 52:609-616.
- Ponglowhapan, S., Essén-Gustavsson, B., & Linde-Forsberg, C. 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 62:1498-1517.
- Quintela, A.T., Gusmão, A.L., Lopes, M.D., Silva, J.C., Alvarenga, M.A., Resende J., Menezes, M., Portela, A.P. & Almeida, A.K. 2004. Hyposmotic test with distilled water to evaluate sperm plasma membrane integrity of dog semen – preliminary data. In: *International Congress of Animal Reproduction*, 15, 2004, Anais... Porto Seguro: CBRA, p.518.
- Romagnoli, S. 2002. Canine artificial insemination with fresh, refrigerated and frozen semen. In: *Veterinary Sciences Congress*, 2002, Anais... Oeiras: SPCV, p.167-170.
- Rota, A., Peña, A.I., Linde-Forsberg, C. & Rodriguez-Martinez, H. 1999. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 57:199-215.
- Silva, A. R., Satzinger, S., Leite, L. G. & Silva L. D. M. 2004. Gestação obtida por inseminação artificial com sêmen canino refrigerado transportado à distância – relato de caso. *Clin. Vet.* 50: 56-66.
- Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Silva, L.D.M., Chirinéa, V.H., Lopes, M.D. & Souza, F.F. 2006. Prognostic values of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. *Theriogenology*, 66:456-462.
- Strom-Holst, B, Larsson, B., Linde-Forsberg, C. & Rodriguez-Martinez, H. 2000. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J. Reprod. Fertil.* 119:201-206.
- Uchoa, D.C., Satzinger, S., Amaral, M.C., & Silva, L.D.M. 2007. O uso de diferentes diluidotes para inseminação artificial com sêmen canino refrigerado. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Anais... Curitiba:CBRA, p.182.
- Verstegen, J.P., Onclin, K. & Iguer-Ouada, M. 2005. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg-yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Theriogenology*, 64:720-733.
- Yoshida, M. 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:349-355.