

Artículo original:

AVANCES EN CRIOPRESERVACION DE SEMEN EN CANINOS

Avanços técnicos na criopreservação do sêmen de cães

Silva, A. R. (1); H.V. Silva(2)

INTRODUCCIÓN

(1) *Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil*

(2) *Laboratório de Reprodução de Carnívoros, UECE, Fortaleza, CE, Brasil.*

E-mail: legio2000@yahoo.com

Palabras Clave:

Canino, criopreservación, semen

Nos últimos anos, tem-se observado um notório aumento no interesse por parte dos criadores de cães em incrementar a eficiência reprodutiva de seus animais. Com base nisto, a criopreservação do sêmen aliada à inseminação artificial tem se tornado partes integrantes dos programas de reprodução assistida e tem sua aplicação em várias circunstâncias (Kim *et al.*, 2010).

A inseminação artificial (IA) consiste em, após a obtenção do sêmen, depositá-lo no trato genital da fêmea a ser inseminada. Essa técnica pode ser utilizada como um meio alternativo quando da impossibilidade de realização de monta natural, devido a problemas anatômicos, comportamentais e sanitários, ou ainda, quando da utilização de sêmen refrigerado ou congelado. Sendo de principal relevância este último, que possibilita a manutenção da capacidade fecundante em animais de alto interesse zootécnico por um espaço indeterminado de tempo, além de resguardar tais animais do estresse causado pelo seu transporte para fins de acasalamento (Guérin, 1998).

A utilização da técnica da criopreservação seminal associada a inseminação artificial é de fundamental importância para a difusão do material genético de cães. Como consequência, o uso de sêmen canino criopreservado abriu diversas fronteiras para a criação de cães, permitindo a troca de material genético de alto valor zootécnico entre localidades distantes e o armazenamento desse material por períodos indefinidos (Silva, 2005).

O presente trabalho apresenta uma revisão científica abordando diversos aspectos relacionados à criopreservação do sêmen canino, principalmente atentando ao que há de recente nas pesquisas relacionadas a este tema.

MEIOS DILUIDORES

Após coletado, geralmente pela técnica de manipulação digital, o sêmen canino apropriadamente diluído pode ser refrigerado e armazenado em curto prazo, ou congelado por tempo indeterminado, permanecendo potencialmente fecundante quando reaquecido e utilizado em uma IA. Dentre as características que marcam um bom meio diluidor, destacam-se a presença de nutrientes em sua constituição, atividade tamponante, proteção das células contra o choque térmico oriundo do processo de resfriamento, e presença de substâncias crioprotetoras (Concannon e Battista, 1989). Ao longo dos anos, diferentes meios foram utilizados para a diluição do sêmen de cães, como o tampão tris (Silva, 2005), os diluidores à base de água de côco (Cardoso *et al.*, 2005), e o leite desnatado glicosado (Abe *et al.*, 2008). Além destes, muitas empresas desenvolvem seus próprios diluidores comerciais, como o Biladyl® e o Triladyl® (Minitub do Brasil LTDA, Porto Alegre, Brasil), o Biociphos® (IMV Technologies France, L'Aigle, France), o Kenney® (Hamilton Research, South Hamilton, MA, USA), e os sistemas de diluição do Cryogenic Lab of New England (CLONE Bucks, Doylestone, PA, USA).

Apesar da grande diversidade de diluentes, a maioria dos grupos de pesquisa ainda tem utilizado, principalmente, o diluente à base de Tris para a congelação de sêmen canino, pois o mesmo mostra-se superior a outros diluentes (Farstad, 1996; Silva *et al.*, 2000). O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano - H₂NC(CH₂OH)₃) não apenas apresenta atividade tamponante, mas também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a preservação de sua energia (Rodrigues, 1997). Para seu preparo, usualmente, realiza-se a adição de uma hexose (C₆H₁₂O₆), como uma fonte exógena de substrato energético para o espermatozóide (England; Plummer, 1993). Rigau *et al.* (2001) demonstraram que a frutose e a glicose atuam em mecanismos diferentes na célula espermática, sendo que a frutose lhe confere uma motilidade mais rápida e linear. Posteriormente, os mesmos autores (Rigau *et al.*, 2002) demonstraram que a frutose parece ser mais sensível à atividade da enzima hexoquinase, apresentando assim um efeito mais significativo sobre o metabolismo da célula espermática, quando comparada à glicose. Além da hexose, costuma-se adicionar também ao Tris o ácido cítrico, o qual, provavelmente, tem



atuação na preservação do pH do diluente, apresenta efeito antioxidante, e participa do mecanismo de respiração celular (Silva, 2005).

É digno de nota que desde o final do século XX tem sido estudado um diluente à base de água de coco para a preservação do sêmen de diferentes espécies animais (Nunes *et al.*, 2005). A água de coco é uma solução estéril, ligeiramente ácida, contendo proteínas, sais, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento (fito-hormônios) e traços de fosfolípidios. Em adição a sua rica composição, a água de coco possui arginina, lisina e altas concentrações de Na e K, os quais são importantes fatores para a supressão reversível da motilidade e longevidade espermática (Almeida *et al.*, 2002). Além disso, já foi demonstrado que o ácido 3-indol-acético (AIA), um fitormônio presente na água de coco, contribui para sua eficiência na preservação espermática (Toniolli *et al.*, 1996).

Os primeiros estudos que adaptaram o diluente à base de água de coco para a espécie canina iniciaram-se utilizando uma solução in natura (Cardoso *et al.*, 2000), porém, na atualidade, para a padronização das características do meio, foi desenvolvido um processo para a produção da água de coco na forma de pó (ACP®). Atualmente, o ACP tem mostrado grande eficiência na preservação do sêmen de cães, seja por resfriamento a 5 °C (Uchoa *et al.*, 2004; Uchoa *et al.*, 2007) ou por congelamento a -196 °C (Cardoso *et al.*, 2007; Mota-Filho *et al.*, 2011). Ainda, este diluente destaca-se por ser o único que promove um favorecimento ao nascimento de filhotes do sexo feminino, quando utilizado em inseminações artificiais (Uchoa *et al.*, 2012).

CRIOPROTETORES

O processo de criopreservação promove danos na capacidade funcional dos espermatozoides causados pelo choque térmico, o que leva a uma diminuição da fertilidade. Dessa forma, buscando-se reduzir as crioinjúrias, várias substâncias denominadas de crioprotetores têm sido testadas.

Dentre os crioprotetores, a gema de ovo de galinha tem sido comumente utilizada. Acredita-se que sua ação protetora deva-se à presença de uma lipoproteína chamada fosfatidilcolina, que interage com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e propicia a proteção durante o choque térmico (Bouchard *et al.*, 1990). Segundo Foulkes (1977), a gema de ovo previne também a liberação da enzima hialuronidase pelo espermatozoide. Para o sêmen de cães, a maioria dos autores tem utilizado concentrações de gema em torno de 20% no diluente (Farstad e Andersen-Berg, 1989; Martins, 2005; Silva, 2005).

Apesar de seus efeitos benéficos, a gema apresenta alguns inconvenientes, como a possibilidade de transmissão de doenças (Silva *et al.*, 2002a). Deste modo, estudos recentes tem demonstrado ser possível a purificação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), permitindo sua utilização em substituição à gema de ovo integral para a criopreservação de sêmen de cães (Varela-Junior *et al.*, 2009). Segundo Bencharif *et al.* (2008), a adição de 6% de LDL ao diluente Tris promove uma melhoria na sobrevivência espermática após a congelamento, quando comparada ao uso da gema de ovo.

Ainda no propósito de substituir a gema de ovo, outras substâncias de ação extracelular têm sido incorporadas aos diluentes para o sêmen do cão, como o leite desnatado (Rota *et al.*, 2001) e a albumina sérica bovina – BSA (Rodrigues, 1997; Sirivaidiapong *et al.*, 2000; Santos, 2004). Apesar dos animadores resultados das mesmas, a gema de ovo ainda permanece como o principal aditivo aos diluentes para o sêmen de cães.

Os detergentes derivados do dodecil sulfato de sódio (SDS), como o Equex STM (Peña e Linde-Forsberg, 2000) e o Orvus ES (Tsutsui *et al.*, 2000), tem sido adicionados aos meios diluidores para o sêmen de cães no intuito de promover a solubilização das lipoproteínas da gema de ovo integral e aumentar seu potencial de proteção à célula espermática. Tais detergentes podem inclusive ser adicionados aos meios contendo apenas LDL (Benchariff *et al.*, 2012). No entanto, uma exposição prolongada dos espermatozoides ao SDS poderia ser danosa às células, haja vista conferir um excesso de fluidez à sua membrana plasmática.

Em adição à gema, cuja ação é basicamente extracelular, inúmeras substâncias crioprotetoras de ação intracelular têm sido adicionadas aos diluentes. Dentre estas, o glicerol (CH₃H₈O₃) permanece como o crioprotetor mais empregado na congelamento de sêmen nas diferentes espécies. Este crioprotetor penetra a membrana celular através da difusão passiva, permanecendo tanto na membrana quanto no citoplasma (Parks e Graham, 1992). Sua concentração ideal no meio diluído deve ser aquela em que há uma predominância de seus efeitos protetores sobre os efeitos tóxicos. Tal concentração pode ser influenciada por outros componentes do meio, pelo padrão de resfriamento, pelos métodos de congelamento e descongelamento, e pelas características seminais de cada espécie (Watson, 1979). Para cães, as concentrações de glicerol no uso do diluente Tris tem variado entre 4 e 6% de glicerol (Silva *et al.*, 2002b). Já no uso de diluente à base de água de coco (Cardoso *et al.*, 2003), tais concentrações podem variar entre 4 e 8%.

Haja vista os efeitos tóxicos do glicerol, alternativas eficientes e menos danosas às células espermáticas tem sido estudadas. Dentre as substâncias testadas para os cães, verificou-se que nem o dimetilsulfóxido (Olar *et al.*, 1989) nem a dimetilformamida (Lopes *et al.*, 2009; Mota-Filho *et al.*, 2011) promovem um aumento nas taxas de sobrevivência espermática após a descongelamento. Por outro lado, em um estudo único, foi demonstrada a obtenção de uma taxa de concepção de 42,8% após inseminação artificial com sêmen canino criopreservado no uso de metanol como crioprotetor (Kim *et al.*, 1994). Ainda, a substituição do glicerol pelo etilenoglicol tem sido bastante controversa, pois alguns autores mostraram que os resultados in vitro com etilenoglicol são similares (Soares *et al.*, 2002) ou até mesmo superiores ao glicerol (Rota *et al.*, 2006). Por outro lado, Martins-Bessa *et al.* (2006) demonstraram não existirem vantagens na adição do etileno-glicol isoladamente ou associado ao glicerol para a congelamento do sêmen canino, quando comparado ao glicerol isolado. Recentemente, Rota *et al.* (2010) comprovaram que o uso do etilenoglicol, de fato, não promove um incremento nas taxas de concepção após inseminação artificial.

ANTIOXIDANTES

Haja vista a vulnerabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides, principalmente daqueles que passam pelo processo de criopreservação, ao ataque de espécies de oxigênio reativo – do inglês ROS (Alvarez; Story, 1992; Agarwall; Said, 2005), o uso de substâncias com ação antioxidante aos meios diluidores têm sido largamente sugerido no intuito de bloquear o estresse oxidativo (Roca, 2004).

Dentre os diversos antioxidantes, já foi demonstrado que a incorporação de glutamina em altas concentrações (5 mM) aos



ameios diluidores utilizados para a criopreservação do sêmen de cães promove um incremento na longevidade espermática pós-descongelção (Monteiro *et al.*, 2009). Por outro lado, a adição do ácido ascórbico parece ter um efeito negativo sobre a qualidade espermática pós-descongelção (Monteiro *et al.*, 2009).

Em um experimento que testou a adição de diferentes antioxidantes, como a vitamina C (1.5mM), NAC (N-acetyl-l-cysteine; 1.5mM), taurina (0.6mM), catalase (300U/ml), vitamina E (0.3mM) e o B16 [5-(4-dimethylamino-phenyl)-2-phenyl-penta-2,4-dienoic acid; 0.3mM], ao meio diluidor utilizado para a criopreservação de cães, verificou-se que apenas a catalase parecia exercer um efeito significativamente positivo em melhorar a qualidade espermática após a descongelção (Michael *et al.*, 2007).

Em relação ao uso do antioxidante hidroxitolueno butilado – BHT, os resultados são ainda contraditórios. Sahashi *et al.* (2011) afirmam que a adição do BHT em baixas concentrações (0,2 a 0,8 mM) não interfere na qualidade do sêmen canino após a descongelção. Inclusive, estes autores afirmam que a elevação desta concentração para 1,6 mM promoveria uma redução na motilidade, viabilidade e integridade acrossomal no espermatozóide canino. Por outro lado, Neagu *et al.* (2010) recentemente demonstraram que a adição de 1 mM de BHT aos diluentes à base de Tris (Uppsala extender) resulta em um incremento na preservação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides caninos após a descongelção.

ANTIBIÓTICOS

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. De modo geral, a penicilina e a estreptomicina tem sido a associação mais utilizada na elaboração de diluentes para o sêmen de cães (Álamo *et al.*, 2005, Martins-Bessa *et al.*, 2006). Já foi também demonstrado que a benzilpenicilina benzatina quando adicionada ao ACP® não controla o crescimento bacteriano e não influencia a qualidade espermática após a criopreservação do sêmen canino (Barbosa *et al.*, 2010).

Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que não é necessária a adição de antibióticos ao meio utilizado na diluição do sêmen do cão destinado a criopreservação (Silva *et al.*, 2006a, b; Cardoso *et al.*, 2007).

DILUIÇÃO E ENVASE

A proporção de meio diluidor em relação ao número de espermatozoides tem também variado. De modo geral, alguns trabalhos reportam o uso de uma diluição baseada em uma concentração espermática pré-fixada variando de 100 (Tsutsui *et al.*, 2000) a 800 milhões (Peña e Linde-Forsberg, 2000) de espermatozoides por mL. A vantagem deste método seria o conhecimento exato da quantidade de espermatozoides a ser utilizada para a inseminação artificial.

Alternativamente, a diluição pode também ser realizada por meio de um volume fixo, adotando-se uma parte de sêmen uma parte de diluente (Cardoso *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003), duas partes de diluente (Silva e Verstegen, 1995), três partes de diluente (Yildiz *et al.*, 2000), e até quatro partes de diluente (England e Ponzio, 1996).

Segundo esse método de diluição, não existe necessidade de se contar os espermatozoides, rendendo mais praticidade ao procedimento e reduzindo o tempo e os custos envolvidos com a congelção do sêmen.

O sêmen canino pode ser envasado de diferentes formas como minitubos, pastilhas (Nizanski *et al.* (2003) ou tubos de alumínio (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997). No entanto, a congelção em palhetas é a melhor técnica para o armazenamento do sêmen canino, haja vista que estas permitem uma fácil identificação do doador de sêmen e reduzem a possibilidade de contaminação, que se torna importante com o movimento de sêmen congelado entre os países (Farstad, 1996).

Ainda, um interessante estudo recentemente demonstrou que o sêmen de cães poderia ser acondicionado em microcápsulas de alginato e poli-lisina imediatamente após a diluição, sendo então submetido ao envase e a criopreservação. Tais microcápsulas promoveriam uma maior proteção ao sêmen durante o procedimento, e poderiam acarretar uma melhora na qualidade seminal pós-descongelção (Shah *et al.*, 2011).

MÉTODOS DE CONGELAÇÃO

Corriqueiramente, o sêmen de cães tem sido congelado utilizando-se o método inicialmente descrito por Andersen (1975) com modificações. Neste método, preconiza-se a diluição do sêmen a 37 °C em Tris acrescido de gema de ovo e glicerol. Em seguida, procede-se um período de equilíbrio de três horas, seguido do envase em palhetas plásticas e a exposição aos vapores de nitrogênio para congelção.

Métodos de congelção preconizando curvas de resfriamento mais rápidas têm sido também descritos. Por exemplo, um método de congelção do sêmen caprino (Nunes *et al.*, 1997) que requer um tempo de equilíbrio de apenas 40 minutos foi adaptado para cães por Silva *et al.* (2000). Em 2006, Silva *et al.* mostraram que o sêmen canino diluído em Tris e congelado através desse método é capaz de manter sua capacidade de fertilização *in vitro*, tendo sido observada uma taxa de 72,7% de interações entre espermatozoides descongelados e oócitos homólogos.

Recentemente, tem sido também descrita a possibilidade de vitrificação do sêmen de cães. Segundo este procedimento, as amostras de sêmen são adicionadas de glicerol a 5% como crioprotetor. Em seguida, as amostras são expostas ao vapor de nitrogênio por até 2 minutos, e finalmente imersas no nitrogênio líquido (Kim *et al.*, 2012). Além disso, já foi também demonstrado que o sêmen de cães pode ser eficientemente vitrificado através da adição de sacarose (0,25 mM) ao meio HTF contendo 1% de BSA, resultando em mais de 40% de espermatozoides móveis quando da descongelção. Embora tenham sido mostrados excelentes resultados *in vitro*, ainda não se tem informações acerca do nascimento de filhotes a partir da vitrificação.

Outro fator importante para o estudo dos métodos de congelção de sêmen de cães tem sido o uso de diferentes equipamentos para o abaixamento da temperatura, como: tanques de congelção (Peña e Linde-Forsberg, 2000), ultra-freezers (Álamo *et al.*, 2005; Batista *et al.*, 2012), máquinas computadorizadas de congelção (Rota *et al.*, 2005; Schaefer-Somi *et al.*, 2006). Esses equipamentos têm mostrado melhores resultados que os métodos convencionais que utilizam a exposição direta aos vapores de nitrogênio, pois impedem a ocorrência de oscilações térmicas durante a congelção, possibilitando uma melhora nos resultados após a descongelção.



Necessário ainda salientar a possibilidade de manutenção do sêmen canino sob refrigeração, até que seja iniciado o procedimento de criopreservação (Chirinéa *et al.*, 2006; Hermansson e Linde-Forsberg, 2006). Devido ao fato de que existem ainda relativamente poucos centros aptos à congelação do sêmen de cães em alguns países, a possibilidade de transporte do sêmen canino sob refrigeração até os laboratórios aparece como uma importante perspectiva para a difusão da tecnologia de sêmen nessa espécie.

DESCONGELAÇÃO

De maneira análoga ao processo de congelação espermática, existem vários protocolos preconizando diferentes temperaturas e velocidades de descongelação para o sêmen canino. Usualmente, este processo é realizado sob imersão em banho-maria a temperaturas que variam de 37 °C (Linde-Forsberg, 1991) a 75 °C (Olar *et al.*, 1989). Badinand *et al.* (1990) sugerem que a descongelação do sêmen a 37 °C por 45s é um método seguro, pois o tempo de permanência em temperaturas altas poderia ser crítico e de influência letal sobre a viabilidade espermática. Do mesmo modo, Silva *et al.* (1998) sugerem que a temperatura de 37°C por 60s promove uma menor porcentagem de alterações morfológicas espermáticas do que a de 50°C por 30s.

Por outro lado, Ivanova-Kicheva *et al.* (1995), comparando os processos de descongelação a 37 °C por 8s e 55 °C por 5s, observaram que a motilidade espermática foi melhor preservada a 55 °C e sugeriram que a elevação da temperatura de descongelação reduz o dano osmótico nas células, além de prevenir a formação de cristais. Em adição, Nothling *et al.* (2007) sugeriram, recentemente, que o sêmen de cães apresentaria uma melhor qualidade quando descongelado a temperaturas entre 70 a 75 °C ao invés de temperaturas entre 35 a 38 °C.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde o nascimento da primeira ninhada de cães a partir do uso do sêmen congelado (Seager, 1969), o interesse nessa biotécnica tem sido estimulado entre pesquisadores e, principalmente, entre os criadores de cães. Entretanto, apesar de toda a evolução das pesquisas científicas, uma perda considerável em torno de 30 a 40% dos espermatozoides após a descongelação tem sido observada em qualquer tipo de tratamento que o sêmen seja submetido. Deste modo, o campo da criopreservação espermática e da inseminação artificial na espécie canina permanece ainda em aberto, sendo sempre buscado o aperfeiçoamento destas metodologias.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, Y.; D.S. Lee; H. Sano; K. Akiyama; Y. Yanagimoto-Ueta, T. Asano, Y. Suwa; H. Suzuki, 2008. Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender. *J Reprod Dev.* Aug;54 (4):290-4.
- Agarwall, A.; T.M. Said. 2005. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int.* 95:503-7.
- Álamo, D.; M. Batista; F. Gonzalez; N. Rodriguez; G. Cruz; F. Cabrera; A. Gracia. 2005. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152 degrees °C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*, 63:72-82.
- Almeida, R.; A.E.E. Soares. 2002. Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (*Apis mellifera*; *Hymenoptera*: *Apoidea*). *Interciencia*. 27:317-21.

- Alvarez, J.G.; B. Storey.1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl*;13:232-41.
- Andersen, K. 1975. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchtygiene*, 10:1-4.
- Badinand, F.; A. Fontbonne; C. Adoue. 1990. Préparation, conditionnement, conservation et utilisation de la semence du chien en insémination artificielle. *Elev Ins*, 239:3-15.
- Barbosa, C.C.; V.L.H., Madeira; R.P. Jucá; A.C. Oliveira; D.C. Uchoa; A.Q. Pinheiro; L.D.M. Silva. 2010. Diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina no sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®). *Rev. Bras. Saúde Prod.* 11:270-281.
- Batista, M.; M. Santana; T. Niño; D. Alamo; F. Cabrera; F. Gonzalez; A. Gracia. 2012. Sperm viability of canine and caprine semen samples preserved in a dry shipper. *Animal Reproduction Science*. 130:105-110.
- Bencharif, D.; L. Amirat-Briand; A. Garand; M. Anton; E. Schmitt; S. Desherces; G. Delhomme; M.L. Langlois; P. Barrière; S. Destrumelle; O. Vera-Munoz; D. Tainturier. 2012. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex® STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Res Vet Sci*. 93:440-7.
- Bencharif, D.; L. Amirat; M. Anton; E. Schmitt; S. Desherces; G. Delhomme; M.L. Langlois; P. Barrière; M. Larrat; D. Tainturier. 2008. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*70: 1478-1488.
- Bouchard, G.F.; J.K. Morris; J.D. Sikes; R.S. Youngquist. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology*, 34: 147-157.
- Cardoso, R.C.S.; A.R. Silva; D.C. Uchoa; L.D.M. Silva. 2000. Congelação do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. *Ciência Animal*, 10:29-36.
- Cardoso, R.C.S.; A.R. Silva; D.C. Uchoa; L.D.M. Silva. 2003. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, 59:743-751.
- Cardoso, R.C.S.; A.R. Silva; L.D.M. Silva. 2005. Use of the powdered coconut water (ACP®-106) for cyopreservation of canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 2: 257-262.
- Cardoso, R.C.S.; A.R. Silva; L.D.M. Silva; V.H. Chirinéa; F.F. Souza; M.D. Lopes. 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.
- Chirinéa, V.H.; M.I.M. Martins; F.F. Souza; J.M. Tebet; F.O. Papa; M.D. Lopes. 2006. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. *Ci Anim Bras*, 7: 407-415.
- Concannon, P.W; M. Battista M. 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk RW. (Ed.). *Current veterinary therapy. Philadelphia: WB Saunders*, 1247-1259.
- England, G.C.W.; P. Ponzio.1996. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, 46,:165-171.



- England, G.C.W.; J.M. Plummer. 1993. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47: 261 – 270.
- Farstad, W.; K. Andersen-BerG. 1989. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J Reprod Fertil*, 39.:289-292.
- Farstad, W. 1996. Sêmen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, 42.:251-260.
- Foulkes, J.A. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 49.:277-284.
- Guérin, C. 1998. A inseminação artificial na espécie canina. *A Hora Veterinária*, 105: 25-32.
- Hermansson, U.; C. Linde-Forsberg. 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, 65: 584-593.
- Ivanova-Kicheva, M.G.; M.S. Subev; N.D. Bobadov; D.P. Dacheva; L.A. Rouseva. 1995. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology*, 44: 563-569.
- Ivanova-Kicheva, M.G.; N.D. Bobadov; B. Somlev. 1997. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. *Theriogenology*, 48: 1343-1349.
- Kim, S.; Y. Lee; H. Yang; Y.J. Kim. 2012. Rapid freezing without cooling equilibration in canine sperm. *Anim Reprod Sci*. Jan;130:111-8.
- Kim, S.H.; D.H. Yu. 2010. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Anim. Reprod. Sci.* 119: 106–114.
- Kim, Y.J.; Y.J. Park; B.J. Kim; I.J. Yu. 1994. Artificial insemination with frozen semen in the dog – simple freezing method using methanol. *Korean J Vet Res*, 34:851-855.
- Linde-Forsberg, C. 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am*, 21:467-485.
- Lopes, K.R.F.; L.L.M. Costa; G.L. Lima; A.L.P. Souza; A.R. Silva. 2009. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 72; 650–654.
- Martins, M.I.M. 2005. Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães. 120f. Tese (Doutorado) - *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu*.
- Martins-Bessa, A.; A. Rocha; A. Mayenco-Aguirre. 2006. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in Tris-egg yolk extenders. *Theriogenology*, .66: 2047-2055.
- Michael, A.; C. Alexopoulos; E. Pontiki; D. Hadjipavlou-Litina; P. Saratsis; C. Boscos. 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 68(2):204-12.
- Monteiro, J.C.; J.S. Gonçalves; J.A. Rodrigues; C.F. Lúcio; L.C. Silva; M.E. Assumpção; C.I. Vannucchi. 2009. Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen. *Reprod Domest Anim*. 44 Suppl 2:359-62.
- Mota-Filho, A.C.; C.H.A. Teles; R.P. Jucá; J.F.S. Cardoso; D.C. Uchoa; C.C. Campello; A.R. Silva; L.D.M. Silva. 2011. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology*. 76(7): 1367-1372.
- Neagu, V.R.; B. Macias-Garcia; C. Salazar-Sandoval; A. Morillo-Rodriguez; C. Ortega-Ferrusola; L. Gonzalez-Fernandez; J.A. Tapia; F.J. Peña. 2010. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology* 73. 645–650.
- Nizanski, W.; A. Dubiel. 2003. The effect of packaging systems on post-thaw spermatozoal characteristics in cryopreserved dog semen. *Med Wet*, 59:829-833.
- Nöthling, J.O.; S.M. Dolieslager; R. Fillekes; B. Colenbrander. 2007. Thawing dog spermatozoa in just-boiled water: submersion time and effect on sperm quality compared to thawing in water at 70 degrees C. *Theriogenology*. 68:530-7.
- Nunes, J.F.; A.L.T. Ciriaco; U. SuassunA. 1997. Produção e reprodução de caprinos e ovinos. Brasil: *Gráfica LCR*.
- Nunes, J.F.; C.C.M. Salgueiro; J.M. Gondim. 2005. Novos produtos com base na água de coco em pó. In: *12ª Senana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria - FRUTAL*, Fortaleza. Anais, Fortaleza: FRUTAL.
- Olar, T.T.; R.A. Bowen; B.W. Pickett. 1989. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, 31: 451-461.
- Parks, E.J.; J.K. Graham. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38:209-222.
- Peña, A.; C. Linde-Forsberg. 2000. Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing rates on postthaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54.:859-875.
- Rijsselaere, T. 2005. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology*, 64:706-719.
- Roca, J.; M.A. Gil; M. Hernandez; I. Parrilla; J.M. Vazquez; E.A. Martinez. 2004. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J Androl*;25:397–405.
- Rodrigues, B.A. 1997. Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado. 176f. *Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre*.
- Rota, A.; C. Milani; G. Cabianca; M. Martini. 2006. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, 65:1848-1858.
- Rota, A.; C. Milani; S. Romagnoli; P. Zucchini; A. Mollo. 2010. Pregnancy and conception rate after two intravaginal inseminations with dog semen frozen either with 5% glycerol or 5% ethylene glycol. *Anim Reprod Sci*. 118(1):94-7.
- Rota, A.; A. Frishling; I. Vannozi; F. Camillo; S. Romagnoli. 2001. Effect of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil*, 57;377-381.
- Rigau, T.; M. Farré; J. Ballester; T. Mogas; A. Peña; J.E. Rodriguez-Gil. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, 56:815-829.
- Rigau, T.; M. Rivera; M.J. Palomo; J.M. Fernandez-Novell; T. Mogas; J. Ballester; A. Peña; P.J. Otaegu; J.J. Guinovart; J.E. Rodriguez-Gil. 2002. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction*, 123;579-591.



- Sahashi, Y.; T. Otsuki; S. Higaki; M. Nagano; Y. Yamashita; M. Hishinuma. 2011. Effect of butylated hydroxytoluene on dog sperm longevity in chilling storage and cryopreservation. *J Vet Med Sci*, 73(7):895-9.
- Santos, I.W. 2004. Albumina sérica bovina como fonte protéica do diluidor Tris (hidroximetil amino metano) para congelação do sêmen canino. 2004. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
- Seager, S.W.J. 1969. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *Artificial Insemination Digest*, 17-26.
- Schafer-Somi, S.; S. Kluger; E. Knapp; D. Klein; C. Aurich. 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, 66: 173-182.
- Shah, S.; T. Otsuki; C. Fujimura; C. Yamamoto; Y. Yamashita; S. Higaki; M. Hishinuma. 2011. Cryopreservation of microencapsulated canine sperm. *Theriogenology*, 75(4):679-86.
- Silva, A.R.; R.C. Cardoso; D.C. Uchoa; L.D.M. Silva. 2002b. Canine semen cryopreservation with different glycerol concentrations. *Rev Bras Ci Vet*, 9:25-28.
- Silva, A.R.; R.C.S. Cardoso; L.D.M. Silva. 2006. Comparação entre a água de coco em pó (ACP®) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 43: 767-774.
- Silva, A.R.; R.C.S. Cardoso; L.D.M. Silva. 1998. Efeito do processo de descongelação sobre a viabilidade do sêmen canino in vitro. *Ci Anim*, 8: 75-80.
- Silva, A.R.; R.C.S. Cardoso; D.C. Uchoa; L.D.M. Silva. 2002a. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine sêmen freezing. *The Vet J*, 164:244-246.
- Silva, A.R.; R.C.S. Cardoso; D.C. Uchoa; L.D.M. Silva. 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59: 821-829.
- Silva, L.D.M.; J. Verstegen. 1995. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 44: 571-579.
- Silva, A.R. 2005. Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos. 2005. 165f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza.
- Silva, A.R.; R.C.S. Cardoso; L.D.M. Silva. 2000. Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. *Ciência Rural*, 6:1021-1025.
- Silva, A.R.; R.C.S. Cardoso; L.D.M. Silva, L.D.M. 2003. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias (RPCV)*, 98: 53- 60.
- Sirivaidyapong, S.; F.P. Cheng; A. Marks; W.F. Voorhout; M.M Bever; B. Colenbrander. 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology*, 53:789-802.
- Soares, M.P.; C.A.R., Rossi; A. Mezzalira; M. Cecim. 2002. Etilenoglicol na criopreservação de sêmen canino. *Ci Rur*, 32:649-655.
- Toniolli, R.; J. Bussière; M. Courot; M. Magistrini; Y. Combarnous. 1996. Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on the preservation at 15 degrees C of boar semen for artificial insemination. *Reprod Nutr Dev*. 36:503-11.
- Tsutsui, T.; M. Hase; T. Hori; K. Komoriya; N. Shimizu; K. Nagakubo; E. Kawakami. 2000. Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. *J Vet Med Sci*, 62: 537-538.
- Uchoa, D.C.; S. Satszinger; M.C. Amaral; L.D.M. Silva. 2007. O uso de diferentes diluidores para inseminação artificial com sêmen canino refrigerado. In: *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17*, Curitiba. Anais. Belo Horizonte, CBRA.
- Uchoa, D.C.; T.F.P. Silva; A.A. Araújo; L.D.M. Silva. 2004. Uso da água de coco em pó (ACP-106®) na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas. In: *IX Semana Universitária-UECE, 2004*, Fortaleza. Anais. Fortaleza, UECE.
- Uchoa, D.C.; T.F.P. Silva; J.F.S. Cardoso; A.C. Mota-Filho; R.P. Jucá; A.R. Silva; L.D.M. Silva. 2012. Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). *Theriogenology*, 77:1959-1963.
- Varela Junior, A.S.; C.D. Corcini; R.R. Ulguim; M.V.F. Alvarenga; I. Bianchi; M.N. Corrêa; T. Lucia Jr.; J.C. Deschamps. 2009. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Animal Reproduction Science* 115. 323-327.
- Watson, P.F. 1979. The preservation of semen in mammals. *Oxford Rev Reprod Biol*, 1:183-350.
- Yildiz, C.; A. Kaya; M. Aksoy; T. Tekeli. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54:579-585.

