



Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens

Alternatives for the improvement of semen cryopreservation in wild animals

A.L.P. Souza, G.L. Lima, A.R. Silva¹

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido (Ufersa), Mossoró, RN, Brasil.

¹Correspondência: legio2000@yahoo.com

Resumo

A criopreservação de sêmen é uma biotécnica importante para a reprodução e manutenção da diversidade genética de animais selvagens. Apesar dos avanços já alcançados, evidencia-se a necessidade de novos estudos vislumbrando o uso de novas substâncias que possam oferecer maior proteção à célula espermática. Para tanto, este trabalho apresenta uma revisão no tocante às inovações a serem incorporadas como alternativas, no intuito de aprimorar os protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens.

Palavras-chave: antioxidantes, banco de germoplasma, congelamento, crioprotetores, espermatozoides.

Abstract

The semen cryopreservation is an important biotechnique for the reproduction and maintaining of the genetic diversity in wild animals. Despite the improvements reached in the use of this biotechnique, there is a highlighted need for studies that show the use of new substances, which could contribute to sperm protection. Thus, this study presents a review about innovations that could be incorporated as alternatives for the improvement of protocols for semen cryopreservation in wild animals.

Keywords: antioxidants, cryoprotectant, freezing, gene bank, sperm.

Introdução

A conservação de espécies ameaçadas baseia-se em projetos *in situ*, realizados em ambiente natural, e *ex situ*, realizados *in vivo* com manutenção de animais em cativeiro e/ou *in vitro*, pela formação de bancos de germoplasma (Domingues et al., 2011). Tais estratégias são importantes para reprodução de animais selvagens e manutenção da diversidade genética, permitindo, por meio da formação dos criobancos, a superação do tamanho limitado das reservas e dos zoológicos (Wilson, 1997).

A criopreservação, porém, expõe os espermatozoides a situações de estresse, sendo necessário o desenvolvimento de protocolos adequados, que permitam sua preservação por curtos (resfriamento) ou longos períodos (congelamento). O ajuste desses protocolos requer o estudo de fatores que podem afetar o sucesso da criopreservação, como a formulação de diluentes adequados às características inerentes a cada espécie, haja vista que tais características podem variar, não possibilitando a extrapolação direta de uma espécie para outra. Assim, esta revisão apresenta diferentes alternativas para o aperfeiçoamento de protocolos de criopreservação de espermatozoides em espécies selvagens, apresentando inovações acerca de diluentes, crioprotetores e aditivos que poderiam contribuir para elevação da taxa de sobrevivência espermática.

Diluentes alternativos

Um diluente para sêmen deve apresentar ação tamponante, uma combinação ajustada de nutrientes, ser de baixo custo, oferecer proteção contra danos causados pelas mudanças de temperatura, e proporcionar estabilidade dos sistemas enzimáticos e integridade da membrana plasmática (Amann e Pickett, 1987). Dentre os diluentes mais utilizados, destaca-se aquele à base de Tris (tris-hidroximetil-aminometano), utilizado em coiotes (*Canis latrans*; Minter e DeLiberto, 2005), felinos (*Prionailurus viverrinus*; Thiangtum et al., 2006), cães africanos (*Lycan pictus*; Johnston et al., 2007), macacos-prego (*Cebus apela*; Oliveira et al., 2011) e catetos (*Pecari tajacu*; Silva et al., 2012). Outra opção tem sido o diluente à base de TES (ácido sulfônico N-tris-hidroximetil-metil-2-aminometano), descrito para ursos (*Ursus thibetanus japonicus*; Okano et al., 2006) e linceos pardos (*Lynx rufus*; Gañán et al., 2009). Uma associação entre diluentes à base de Tris e TES (TEST yolk buffer - TYB) já foi também utilizada para leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*; Pukazhenthil et al., 2006), sagui-do-tufo-branco (*Callithrix jacchus*; Valle, 2007) e pequenos felinos (*Felis nigripes* e *Felis margarita*; Herrick et al., 2010). Além disso, um diluente comercial denominado Bioxcell (IMV, L'Aigle, França), inicialmente disponível



para bovinos, tem sido também sugerido para conservação do sêmen de alpacas (*Lama Pacos*; Vaughan et al., 2003).

Diluentes à base de água de coco têm surgido como alternativa e mostrado resultados satisfatórios na conservação de gametas de diversas espécies domésticas (Uchoa et al., 2012). A água de coco é composta por proteínas, sais, açúcares e minerais. Sua fração ativa foi identificada como um fitormônio promotor de crescimento celular, denominado ácido 3-indol-acético, conhecido por promover um incremento na conservação espermática em mamíferos (Blume e Marques Jr., 1994). Em animais selvagens, já foi demonstrado que esses diluentes são eficientes para manutenção da qualidade espermática em macacos-prego (Oliveira et al., 2011), catetos (Silva et al., 2012) e cutias (Castelo et al., 2013).

O uso de diluentes contendo lecitina de soja em concentrações variando de 1% (Forouzanfar et al., 2010) a 10% (Akhter et al., 2012) tem sido sugerido para ruminantes. Em bovinos, a ação da lecitina proporciona resultados similares aos obtidos com diluentes à base de Tris-gema de ovo (Papa et al., 2011). Em animais selvagens, no entanto, não existem relatos do uso de diluentes à base dessa substância, os quais poderiam também ser uma alternativa para o aperfeiçoamento dos protocolos.

Crioprotetores alternativos

O uso de crioprotetores se baseia no princípio de que a adição de solutos à água reduz a temperatura de congelamento, retardando o aparecimento de cristais de gelo (Karow, 2001). Em animais domésticos, o glicerol e a gema de ovo são rotineiramente utilizados como crioprotetores, sendo efetivamente adaptados a espécies selvagens como rinocerontes (*Ceratotherium sp*; Hermes et al., 2005), leopardos-nebulosos (Pukazhenth et al., 2006), ursos (*Ursus arctos*; Okano et al., 2006), impalas (*Aepyceros Melampus*; Chatiza et al., 2011) e macacos-prego (Oliveira et al., 2011).

Apesar dos efeitos benéficos, o glicerol apresenta certa toxicidade às células, sendo necessária a identificação de sua concentração ideal para cada espécie (Holt, 2000). Como exemplo, em catetos, Alves et al. (2012) avaliaram o uso do glicerol (3 e 6%) e da gema de ovo (5, 10 e 20%) para criopreservação do sêmen e verificaram que a associação de 20% de gema com 6% de glicerol apresentou melhores resultados. Ainda, outros crioprotetores como o etilenoglicol (*Cervus elaphus hispanicus*; Fernandez-Santos et al., 2006), dimetilsulfóxido (*Macaca mulatta*; Si et al., 2004), propilenoglicol (*Elephas maximus*; Saragusty et al., 2009), e dimetilacetamida (*Dromaius novaehollandiae*; Sood et al., 2012) foram testados em espécies selvagens, porém com resultados menos satisfatórios que aqueles obtidos com o glicerol.

Em contraposição aos efeitos benéficos da gema, sabe-se que algumas substâncias que a compõem dificultam a respiração celular, interferindo no sistema de transporte de elétrons nas mitocôndrias (Bousseau et al., 1998). Além disso, por se tratar de um produto de origem biológica, o qual poderia propagar microrganismos patogênicos, alguns países impõem restrições à circulação de sêmen, quando a gema está presente na composição do diluente (Linde-Fosberg, 2001). Desta forma, como a crioproteção da gema é promovida pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL; Bergeron et al., 2004), o uso da LDL purificada surge como uma alternativa eficiente para criopreservação de sêmen em cães (Benchariff et al., 2010), equinos (Martin, 2005) e bovinos (Hu et al., 2011). Nas espécies selvagens, porém, a LDL não tem apresentado benefícios à criopreservação do sêmen conforme demonstrado em macacos rhesus (Dong et al., 2011) e veados (*Cervus elaphus hispanicus*), sendo necessários outros estudos que objetivem a padronização de seu uso.

No intuito de reduzir eventuais problemas de contaminação e disseminação de doenças causadas por produtos de origem animal, têm-se buscado substâncias de origem vegetal que possam conferir proteção ao sêmen. O *Aloe vera* apresenta-se como uma alternativa por possuir, em sua composição, substâncias similares aos crioprotetores convencionais, além de conter diversas propriedades antioxidantes e de regeneração celular (Aires et al., 2003). Os primeiros estudos com a utilização do gel de *Aloe vera* como diluente seminal para inseminação artificial em ovelhas são datados da década de 80 (Rodríguez et al., 1988). Em 2006, Gutiérrez et al. utilizaram 40% de *Aloe vera* para congelamento do sêmen ovino e observaram 85% de espermatozoides viáveis imediatamente após a diluição e, com 48 h após a descongelamento, a taxa atingiu 60%. Recentemente, o uso da *Aloe vera* sp. tem sido associado a trabalhos de refrigeração de sêmen de caprinos (Aguiar et al., 2012) e caninos (Lima et al., 2013). Nos animais selvagens, no entanto, a *Aloe Vera* permanece como uma alternativa ainda inexplorada.

Substâncias detergentes

A incorporação de substâncias detergentes ao meio de congelamento tem melhorado a qualidade, a longevidade e a fertilidade dos espermatozoides pós-descongelamento (Penã et al., 2003). O detergente parece atuar tanto sobre a gema, solubilizando os fosfolípidos, quanto sobre a membrana espermática, aumentando a permeabilidade e, com isso, tem causado redução no estresse osmótico, o que resulta em aumento na integridade da membrana e na motilidade pós-descongelamento (Maia et al., 2008). Compostos que têm como princípio ativo o dodecil-sulfato de sódio (SDS) têm sido largamente utilizados em espécies domésticas (Maia et al., 2008). Nas



selvagens, Morton et al. (2010) demonstraram que a presença de SDS (Equex[®] STM - Nova Chemical Sales, Scituate Inc., MA, EUA) na concentração de 1% em meios para congelamento favorece a motilidade, mas afeta negativamente a integridade acrossomal de espermatozoides de alpacas (*Vicugna pacos*). Ao contrário, em lhamas (*Lama glama*; Von Baer e Hellemann, 1999) e lobos-cinzentos (*Canis lupus*; Zindl et al., 2006), verificou-se uma melhora nos resultados de integridade e viabilidade de membrana após a descongelamento do sêmen. Em adição, De Mercado et al. (2010) relataram que o efeito do Equex[®] STM na criopreservação de sêmen do porco ibérico (*Sus Scrofa domesticus*) depende da concentração utilizada, o que instiga pesquisas neste sentido.

Antioxidantes

Os processos de refrigeração e congelamento do sêmen podem resultar em lesões espermáticas causadas por espécies reativas de oxigênio (EROs), que inviabilizam a célula espermática para uma posterior inseminação artificial (IA). Como forma de diminuir esses danos, os antioxidantes fornecem hidrogênio para o radical livre, promovendo sua estabilização, e interrompendo a reação de propagação (Swenson e Reece, 1996). Os antioxidantes são classificados em primários e secundários. Os primários incluem os compostos fenólicos poli-insaturados, e os fenóis com impedimento estrutural (butil hidroxianisol - BHA, butil hidroxitolueno - BHT, butil hidroxiquinona - TBHQ e tocoferóis). Os secundários ou sinérgicos são classificados de forma genérica como removedores de oxigênio e complexantes, sendo o ácido ascórbico o principal antioxidante desse grupo (Araujo, 2001).

Em caprinos, demonstrou-se que a adição de antioxidantes, em especial do ácido ascórbico e do BHT, promove melhores resultados de integridade de membrana, de acrossoma e de viabilidade pós-descongelamento, bem como de fertilidade, quando se compara à ausência desses compostos no meio diluente (Memon et al., 2012). De fato, antioxidantes como o BHT têm tido ampla utilização para a conservação espermática em várias outras espécies, como búfalos (Ijaz et al., 2009) e cães (Sahashi et al., 2011). Em animais selvagens, até o presente momento, não existem relatos de seu uso.

Considerações finais

A criotecnologia tem permitido significativos avanços na preservação e multiplicação de várias espécies. No entanto, o processo apresenta distintas limitações, sendo necessárias a evolução e a adaptação de diferentes protocolos de criopreservação de gametas de acordo com as características de cada espécie. De modo geral, a aplicabilidade dos resultados, tanto no Brasil como no mundo, apesar de estes serem promissores, apresenta baixa repetitividade, provavelmente devido à não padronização de protocolos adequados que garantam a viabilidade celular.

Nos últimos anos, tem-se observado um amplo desenvolvimento de substâncias adicionadas ao diluente no processo de criopreservação de sêmen em animais domésticos. Com base nesta premissa, considera-se investir no aprimoramento de protocolos que foram eficazes nestes e que possam ser estendidos ao uso em animais selvagens com a realização de adaptações necessárias a cada espécie. Dessa forma, esta evolução será essencial para aumento da eficiência dos programas de enriquecimento e manutenção de germoplasma, contribuindo para a manutenção da biodiversidade.

Referências

- Aguiar GV, Santos BMB, Cavalcante JMM, Rodrigues FRN, Salgueiro CCM.** Adição de *Aloe vera* ao diluente à base de água de coco em pó (ACP-101®) como crioprotetor do sêmen caprino resfriado a 4°C. In: Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal Ciência Animal, 6, Fortaleza, CE. Fortaleza, CE: CONERA, 2012. p.283-286.
- Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E.** In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, v.60, p.269-279, 2003.
- Akhter S, MS Ansari MS, Andrabi SMH, Rakha BA, Ullah N, Khalid M.** Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.815-819, 2012.
- Alves HM, Oliveira IRS, Castelo TS, Lima GL, Souza ALP, Moreira MAP, Paula VV, Silva AR.** Comparison of different glycerol and egg yolk concentrations added to tris-based extender for the collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen freezing. *Reprod Domest Anim*, v.48, p.506-511, 2012.
- Amann RP, Pickett BW.** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, v.7, p.145-173, 1987.
- Araujo JMA.** Química de Alimentos. 2.ed Viçosa, MG: Editora UFV, 2001.
- Bencharif D, Amirat L, Pascal O, Anton MSE, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barriè`re P, Larrat M, Tainturier D.** The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for



- cryopreservation of canine semen. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.189-200, 2010.
- Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P.** Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod*, v.70, p.708-717, 2004.
- Bousseau S, Brillard JP, Marquant L, Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M.** Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, v.50, p.699-706, 1998.
- Blume H, Marques Jr AP.** Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.18, p.97-104, 1994.
- Castelo TS, Praxedes ECG, Souza ALP, Peixoto GCX, Lima GL, Sousa PC, Santos EAA, Campos LB, Bezerra JAB, Silva AR.** Criopreservação de sêmen de cutias (*Dasyprocta aguti*) em diluente à base de água de coco em pó - ACP-109c®. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 20, 2013, Uberlândia, MG. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2013. CD-ROM.
- Chatiza FP, Pieterse GM, Bartels P, Nedambale TL.** Characterization of epididymal spermatozoa motility rate, morphologym and longevity of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*) and blesbok (*Damaliscus dorcus phillipsi*): pre- and post-cryopreservation in South Africa. *Anim Reprod Sci*, v.126, p.234-244, 2011.
- De Mercado E, Rodríguez A, Gómez E, Sanz E.** Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa: Comparison of diferente freezing extenders based on post-thaw sperm quality. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.54-61, 2010.
- Domingues SFS, Lima JS, Oliveira KG, Santos RR.** Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação *in situ* de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.124-129, 2011.
- Dong QX, Rodenburg SE, Hill D, Vandervoort CA.** The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Asian J Androl*, v.13, p.459-464, 2011.
- Fernandez-Santos MR, Estes MC, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ.** Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: effects of concentration and temperature of addition. *J Androl*, v.27, p.734-745, 2006.
- Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH.** In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, v.73, p.480-487, 2010.
- Gañán N, González R, Sestelo A, Garde JJ, Sánchez I, Aguilar JM, Gomendio M, Roldan ERS.** Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous in vitro fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). *Theriogenology*, v.72, p.341-352, 2009.
- Gutiérrez AJ, Cosme RW, Jiménez y CJA, Ramírez GJA.** Agua de coco, suero fetal bovino, *aloe vera* y sus combinaciones para criopreservar semen ovino. *Arch Zootec*, v.55, p.101-104, 2006.
- Hermes R, Hildebrandt TB, Blottner S, Walzer C, Silinski S, Patton ML, Wibbelt G, Schwarzenberger F, Göritz F.** Reproductive soundness of captive southern and northern white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, *C.s. cottoni*): evaluation of male genital tract morphology and semen quality before and after cryopreservation. *Theriogenology*, v.63, p.219-238, 2005.
- Herrick JR, Campbell M, Levens G, Moore T, Benson K, D'Agostino J, West G, Okeson DM, Coke R, Portacio SC, Leiske K, Kreider C, Polumbo PJ, Swanson WF.** In vitro fertilization and sperm cryopreservation in the Black-Footed Cat (*Felis nigripes*) and Sand Cat (*Felis margarita*). *Biol Reprod*, v.82, p.552-562, 2010.
- Holt WV.** Fundamental aspects of sperm cryobiol.: the importance of soecies and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.
- Hu JH, Jiang ZL, Lv RK, Li QW, Zhang SS, Zan LS, Li YK, Li X.** The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*, v.62, p.83-87, 2011.
- Ijaz A, Hussain A, Aleem M, Yousaf MS, Rehman H.** Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.71, p.1326-1329, 2009.
- Johnston SD, Ward D, Lemon J, Gunn I, MacCallum CA, Keeley T, Blyde D.** Studies of male reproduction in captive African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Anim Reprod Sci*, v.100, p.338-355, 2007.
- Karow AM.** Cryobiology for mammalian embryologists. 2001. Disponível em: www.xytextinternational.com/pdf/cryobiology.pdf. Acesso em: 29 abr. 2013.
- Lima CF, Melo CCS, Ramos RP, Neves AKR, Nery LTB, Andrade TGF, Oliveira ECS.** *Aloe vera* sp. é uma alternativa à gema de ovo na refrigeração do sêmen canino a 5°C: resultados preliminares. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 20, Uberlândia, MG. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2013. CD-ROM.
- Linde-Forsberg C.** Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: www.ivis.org.
- Maia MS, Azevedo HC, Bicudo SD, Sousa DB, Rodello L.** Efeito da adição do equex-STM ao diluente tris-gema na



- motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. *Acta Sci Vet*, v.33, suppl.1, p.311, 2008. (resumo).
- Martin CEG.** Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides equinos criopreservados. 2005. 27f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Pelotas, RS, 2005.
- Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM.** Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of boer goat spermatozoa in tris egg yolk glycerol extender. *Anim Reprod Sci*, v.136, p.55-60, 2012.
- Minter LJ, DeLiberto TJ.** Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. *Theriogenology*, v.64, p.1898-1912, 2005.
- Morton KM, Evans G, Maxwell WMC.** Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology*, v.74, p.311-316, 2010.
- Okano T, Nakamura S, Komatsu T, Murase T, Miyazawa K, Asano M, Tsubota T.** Characteristics of frozen-thawed spermatozoa cryopreserved with different concentrations of glycerol in Captive Japanese Black Bear (*Ursus Thibetanus Japonicus*). *J Vet Med Sci*, v.68, p.1110-1104, 2006.
- Oliveira KG, Miranda SA, Leão DL, Brito AB, Santos RR, Domingues SFS.** Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. *Anim Reprod Sci*, v.123, p.75-80, 2011.
- Papa FO, Felício GB, Melo-Oña CM, Alvarenga MA, De Vita B, Trinquê C, Puoli-Filho JNP, Dell'Aqua Jr JA.** Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Anim Reprod Sci*, v.129, p.73-77, 2011.
- Peña A, Lugilde LL, Barrio M, Herradón PG, Quintela LA.** Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.59, p.1725-1739, 2003.
- Pukazhenthil B, Laroe D, Crosier A, Bush LM, Spindler R, Pelican KM, Bush M, Howard JG, Wildt DE.** Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, p.1790-1796, 2006.
- Rodriguez F, Baldassarre H, Simonetti J, Aste F, Ruttle JL.** Cervical versus intrauterine insemination of ewes using fresh or frozen semen diluted with *Aloe vera* gel. *Theriogenology*, v.30, p.843-854, 1988.
- Sahashi Y, Otsuki T, Higaki S, Nagano M, Yamashita Y, Hishinima M.** Effect of Butylated Hydroxytoluene on dog sperm longevity in chilling storage and cryopreservation. *J Vet Med Sci*, v.73, p.895-899, 2011.
- Saragusty J, Hildebrandt TB, Behr B, Knieriem A, Kruse J, Hermes R.** Successful cryopreservation of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.115, p.255-266, 2009.
- Si W, Zheng P, Li Y, Dinnyes A, Ji W.** Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm. *Am J Primatol*, v.62, p.301-306, 2004.
- Silva MA, Peixoto GCX, Lima GL, Bezerra JAB, Campos LB, Paiva ALC, Paula VV, Silva AR.** Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. *Theriogenology*, v.78, p.605-611, 2012.
- Sood S, Malecki IA, Tawang A, Martin GB.** Survival of emu (*Dromaius novaehollandiae*) sperm preserved at subzero temperatures and different cryoprotectant concentrations. *Theriogenology*, v.78, p.1557-1569, 2012.
- Swenson MJ, Reece WO.** *Dukes' Fisiologia dos Animais Domésticos*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- Thiangtum K, Swanson WF, Howard J, Tunwattana W, Tongthainan D, Wichasilpa W, Patumrattanathan P, Pinyopoommintr T.** Assessment of basic seminal characteristics, sperm cryopreservation and heterologous in vitro fertilization in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*). *Reprod Fertil Dev*, v.18, p.373-382, 2006.
- Uchoa DC, Silva TFP, Cardoso JFS, Mota Filho AC, Jucá RP, Silva AR, Silva LDM.** Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). *Theriogenology*, v.77, p.1959-1963, 2012.
- Valle RR.** Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). 2007. 535f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, SP, 2007.
- Vaughan J, Galloway D, Hopkins D.** Artificial Insemination in Alpacas (*Lama pacos*). Barton, ACT, Austrália: Rural Industries Research and Development Corporation. 2003. (Publication, nr. 03/104).
- Von Baer L, Hellemann C.** Cryopreservation of llama (*Lama glama*) semen. *Reprod Domest Anim*, v.34, p.95-96, 1999.
- Wilson EO.** Biodiversidade. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.
- Zindl C, Asa CS, Günzel-Apel AR.** Influence of cooling rates and addition of Equex pasta on cooled and frozen-thawed semen of generic gray (*Canis lupus*) and Mexican gray wolves (*C.l. baileyi*). *Theriogenology*, v.66, p.797-1802, 2006.
-