



## Andrologia e criopreservação de sêmen em cães

*Andrology and dog semen cryopreservation*

José Fabson Pinheiro dos Santos<sup>1</sup>, Elizabete Teixeira Gosmes<sup>2</sup>, Andressa Kathily Macedo Siqueira<sup>3</sup>,  
Rita de Cássia Soares Cardoso<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens (PPGCAP), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

<sup>2</sup>Mestranda no Programa de Sanidade e Reprodução de Ruminantes (PSRR), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup>Graduanda em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

<sup>4</sup>Professora adjunta na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

<sup>5</sup>Correspondência: [ritascardoso@bol.com.br](mailto:ritascardoso@bol.com.br)

### Resumo

O objetivo dessa revisão foi apresentar os aspectos relevantes para avaliação reprodutiva do cão reprodutor e fatores inerentes à congelação de sêmen canino. O exame andrológico é indicado na avaliação da capacidade fértil do cão previamente à cópula, inseminação artificial, e/ou conservação do material genético, bem como na seleção de reprodutores e no diagnóstico de infertilidade e suas causas. Composto principalmente por anamnese, exame físico completo, avaliação do comportamento sexual, espermograma e exames complementares. Durante o exame físico deve-se atentar para doenças congênitas hereditárias, bem como dar uma atenção especial aos testículos e epidídimos. O espermograma constitui parte importantíssima no exame andrológico, desta forma, a avaliação do macho deve ser realizada por um médico veterinário especializado na área para um diagnóstico preciso. Em relação à criopreservação de sêmen na espécie canina, assim como em outras espécies, depende de fatores como diluidor, crioprotetores, velocidade de congelação/descongelação, dentre outros. Apesar do progresso na criopreservação de sêmen canino, tal biotécnica merece uma maior atenção no que diz respeito a fatores inerentes ao ejaculado, o que leva a insucesso na preservação da qualidade espermática.

**Palavras-chave:** Espermograma, congelação, reprodução canina.

### Abstract

*The objective of this review was to present the relevant aspects to reproductive evaluation of the breeder male dog and factors involved in canine semen freezing. The breeding soundness examination is indicated in evaluation of dog breeding potential prior to copulation, artificial insemination, and/or genetic material conservation, as well as in sire selection and diagnosis of infertility and its causes. Mainly composed by anamnesis, complete physical examination, assessment of sexual behavior, semen analysis and complementary tests. During the physical examination, some attention should be paid to hereditary congenital diseases, as well as a special attention to the testis and epididymis. Semen analysis is a very important part of the breeding soundness examination, therefore, the evaluation of the male should be performed by a veterinarian specialized for an accurate diagnosis. Regarding semen cryopreservation in dogs, as in other species, it depends on factors such as extender, cryoprotectants, freezing/ thawing rates, among others. Despite progress in cryopreservation of canine semen, such biotechnical deserves greater attention regarding the inherent ejaculate factors, which leads to failure in preserving sperm quality.*

**Keywords:** spermogram, freezing, canine reproduction.

### Introdução

Nos últimos anos, a criação de cães vem deixando de ser um hobby para tornar-se uma atividade comercial lucrativa. Desta forma, os criadores têm se preocupado mais com os aspectos relacionados à reprodução desses animais com alto valor zootécnico (Silva, 2002), como a capacidade potencial reprodutiva.

O exame andrológico é indicado na avaliação da capacidade reprodutiva do cão previamente à cópula, inseminação artificial, e nos casos em que se pretende realizar a conservação do material genético, bem como na seleção de reprodutores e no diagnóstico de infertilidade e suas causas. Uma das etapas do exame andrológico consiste em avaliar o sêmen, sendo um recurso importante para predizer o potencial fertilizante de um macho. O espermograma é parte essencial na avaliação do trato reprodutivo do mesmo (Meyers-Wallen, 1997). Portanto, a avaliação de sêmen nos cães reprodutores deve ser realizada regularmente (Nelson e Couto, 2015).

Caso a amostra coletada apresente qualidade suficiente para congelação, isso não implica em sucesso no processo, visto que a mesma causa danos às células espermáticas, sendo uma criopreservação eficiente aquela



que causa o mínimo de danos possíveis. A razão para tal fato deve-se a diversos fatores que interferem com a eficiência da preservação como: diluidor, crioprotetores, aditivos, velocidade de congelação, temperatura/tempo de descongelação, além de fatores inerentes aos animais.

Desta forma o objetivo dessa revisão foi apresentar os aspectos relevantes para avaliação reprodutiva do cão reprodutor, bem como alguns fatores inerentes ao processo de criopreservação de sêmen canino.

### Exame andrológico

O exame andrológico se baseia na avaliação da saúde geral, saúde genética, e saúde do sistema genital, ou seja, na avaliação da *potentia coeundi* e *potencia generandi* (CBRA, 2013). Pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013), tal avaliação inicia-se com a identificação do paciente e proprietário, passando para anamnese, exame físico, avaliação do comportamento sexual, espermograma, exames complementares, e finalizando com diagnóstico e emissão do laudo.

#### Anamnese

Nessa parte do exame são coletadas informações gerais sobre o reprodutor, como: alimentação, enfermidades passadas, vacinação, terapia medicamentosa, e viagens realizadas (Meyers-Wallen, 1997). Informação sobre medicamentos administrados são de relevância, visto que várias drogas afetam a libido e a qualidade do sêmen de acordo com Johnson (2006; Tabela 1).

O questionamento de informações específicas quanto à parte reprodutiva dependerá do motivo que levou o proprietário a solicitar o exame andrológico (Feldman e Nelson, 2004). Questiona-se sobre o sucesso ou insucesso em cópulas anteriores, bem como sobre as fêmeas acasaladas (idade, fertilidade e prolificidade), além do tipo de manejo reprodutivo utilizado (inseminação natural ou artificial). Procura-se saber sobre qualidade seminal, se já coletado e avaliado, bem como os resultados de exames realizados previamente, como sorologia para brucelose canina, cultura e citologia do fluido seminal (Johnston et al., 2001).

Tabela 1. Exemplos de medicamentos que afetam negativamente a reprodução.

Libido e Qualidade do Sêmen	
Cimetidina	Anticolinérgicos
Hormônios	Propranolol
▪ Glicocorticóides	Digoxina
▪ Estrógenos	Fármacos SNC
▪ Andrógenos	▪ Clorpromazina
▪ Progestágenos	▪ Barbitúricos
▪ Esteróides anabolizantes	▪ Diazepam
Cetoconazol	Diuréticos tiazídicos
Espironolactona	
Qualidade do Sêmen	
Anfotericina B	
Diversos fármacos anti-cancerígenos, vincristina	

Fonte: Johnson (2006).

#### Exame físico

O exame físico deve ser realizado em duas etapas, exame físico geral e a exame físico específico, referente ao do trato reprodutivo.

#### Exame físico geral

Um exame físico geral rigoroso deve ser realizado (CBRA, 2013) com objetivo de identificar doenças sistêmicas que afetem negativamente à fertilidade do macho e doenças hereditárias, pois estas podem tornar o cão indesejável para reprodução. Se a queixa for libido reduzida ou dificuldade à cópula deve-se avaliar com mais cuidado o sistema músculo-esquelético e neurológico, especialmente (Johnson, 2006).

#### Exame físico específico

A pele do escroto e do prepúcio deve ser avaliada cuidadosamente (Johnson, 2006). O escroto apresenta certa mobilidade em relação aos testículos, e uma espessura uniforme (Feldman e Nelson, 2004). Durante o exame, qualquer alteração de forma, consistência e tamanho deve ser considerado (CBRA, 2013). Quanto ao



prepúcio, esse deve ser facilmente tracionado caudalmente ao bulbo peniano, e não apresentar sinal de fimose (estreitamento da abertura prepucial) (Feldman e Nelson, 2004), cicatrizes ou ferimentos (CBRA, 2013).

De forma conjunta, os testículos, epidídimos e cordões espermáticos devem ser avaliados (Johnson, 2006) quanto à presença ou ausência, localização, dimensões, consistência, simetria, mobilidade e sensibilidade (CBRA, 2013). Os testículos e epidídimos são facilmente diferenciados à palpação, principalmente pela cauda ser ligeiramente mais firme. Caso não seja fácil diferenciá-los à palpação, um ou ambos apresentam anomalia (Johnson, 2006). Deve-se atentar para alterações testiculares congênitas como, microrquidismo (hipoplasia testicular), criptorquidismo (ausência de um ou ambos os testículos no escroto) unilateral ou bilateral, monorquidismo (agenesia de um testículo) e anorquidismo (agenesia de ambos os testículos) (Romagnoli e Schlafer, 2006)

O pênis deve ser exposto para o exame buscando sinais de inflamações, traumatismos, corpos estranhos, (Feldman e Nelson, 2004), secreção excessiva ou neoformações (Meyers-Wallen, 1997).

A próstata pode ser facilmente examinada por palpação retal e abdominal simultaneamente. À palpação retal, a glândula apresenta uma textura ligeiramente áspera, com formato bilobado e simétrico (Johnson, 2006). O tamanho da próstata pode variar de acordo com a raça, faixa etária e peso do animal. Quando identificadas anormalidades quanto ao tamanho, simetria entre lobos, consistência ou sensibilidade à palpação serão indicativos de disfunção prostática, necessitando-se uma avaliação mais acurada desse órgão (Feldman e Nelson, 2004).

### **Comportamento sexual**

A libido deve ser preferencialmente avaliada na presença de uma fêmea em estro (CBRA, 2013). Cães idosos podem apresentar diminuição da libido. Já os cães sexualmente inexperientes ou submissos podem ser intimidados por cadelas dominantes ou ambientes estranhos (Johnson, 2006).

### **Espermograma**

O espermograma, ou seja, análise do sêmen é parte essencial na avaliação do trato reprodutivo do macho, inclusive para diagnosticar afecções nos machos não utilizados para reprodução (Meyers-Wallen, 1997). Quando utilizado para avaliar a qualidade espermática, é realizado através da avaliação da fração espermática (Silva et al., 2002).

Após a coleta o sêmen deve ser avaliado macro e microscopicamente. Na análise macroscópica o sêmen é avaliado quanto ao volume, cor, aspecto e odor. Já microscopicamente são avaliados, a concentração, motilidade, vigor e morfologia espermáticas (CBRA, 2013) e ainda o pH da terceira fração (Johnston et al., 2001). Além destas análises de rotina, para um diagnóstico mais preciso podemos dispor de outros métodos, fáceis e baratos como o teste hiposmótico ou testes mais acurados e dispendiosos, como a análise computadorizada, citometria de fluxo e microscopia fluorescente.

#### *Coleta de sêmen*

O método mais comum para coleta de sêmen no cão é manipulação digital (Johnston et al., 2001) que consiste em massagear o bulbo da glândula de forma a estimular a ejaculação. O ambiente para realização do procedimento deve ser calmo e com piso antiderrapante (Krustritz, 2010). A maioria dos cães ejaculam na ausência de uma fêmea no cio (Johnston et al., 2001), porém, a presença de uma fêmea no cio pode facilitar a coleta e auxiliar na avaliação da libido (Feldman e Nelson, 2004), estando também relacionado a um ejaculado de melhor qualidade (Krustritz, 2010). O ejaculado também pode ser obtido por eletroejaculação, porém normalmente não há a necessidade de utilizar esse método, que pode ainda ocasionar contaminação por urina (Johnston et al., 2001).

O ejaculado canino consiste em três frações, onde apenas a segunda é rica em espermatozoides (fração espermática), e a primeira e a terceira consistem em fluido prostático, responsáveis pela limpeza da uretra e diluição do sêmen, respectivamente (Silva et al., 2002).

Na primeira fração, o cão promove impulsos vigorosos liberando um pequeno volume de fluido transparente. Quando inicia a liberação da segunda fração (cor branca opalescente), os impulsos diminuem ou cessam, nesse momento, o cão procura passar a perna pelo manipulador simulando a posição da cópula, caso ele não faça, o manipulador deve levantar a perna do cão e tracionar o pênis 180° na direção caudal. A terceira fração pode ser diferenciada pelo manipulador através da palpação dos impulsos na região uretral e pela visualização de contrações anais evidentes, bem como pela mudança na coloração de branca opalescente para transparente novamente (Johnston et al., 2001). Para evitar traumas, Krustritz (2010) recomenda que o cão seja colocando no canil apenas após o pênis estar totalmente protegido pelo prepúcio.



### *Volume*

O volume seminal pode variar de acordo com raça, idade, porte e frequência de coleta. A primeira fração tem um volume variável, mas em geral é de 0,5 mL; a segunda varia de 0,5 a 1 mL, podendo chegar a 3 mL; a terceira e última possui um volume variável de 3 - 30 mL (Silva et al., 2002). O volume total pode variar de 1- 80 mL para Johnston et al. (2001), de 2,5 - 80 mL para Johnson (2006) e de 1,5 - 80 mL para o CBRA (2013). Deve-se fazer o registro do volume coletado, antes que alguma amostra seja removida para análise, pois deverá ser utilizado para calcular o número de espermatozoides (Krustritz, 2010).

### *Cor*

A coloração do sêmen é avaliada por inspeção visual, onde o sêmen (segunda fração) normal possui cor branca opalescente. Dentre as colorações anormais, temos a clara, indicando azoospermia; a amarela, contaminação por urina; a castanha, doença prostática; a vermelha, trauma peniano ou doença prostática; e a verde, infecção (Krustritz, 2010) ou até mesmo contaminação pelo esmegma.

### *Aspecto e odor*

O sêmen canino possui aspecto viscoso, devido a concentração espermática (Silva et al., 2002). Com relação ao odor do sêmen canino, segundo o CBRA, (2013) é *sui generis*.

### *Motilidade e Vigor Espermáticos*

A motilidade espermática, percentual de espermatozoides móveis (CBRA, 2013), é um dos parâmetros mais utilizados para a avaliação de espermatozoides, sejam eles frescos ou conservados (Peña, 1997). A motilidade é uma das características necessárias ao espermatozoide para fertilização, embora, a correlação entre a motilidade e fertilidade ainda não esteja totalmente esclarecida (Souza, 2003). No cão, percentual de espermatozoides móveis está estritamente relacionado com o percentual de células morfológicamente normais (Agarwal et al., 2003).

Pode-se avaliar a motilidade de forma subjetiva ao microscópio óptico (Cardoso et al., 2003) ou de forma objetiva por análise computadorizada (Martinez, 2004). Para análise ao microscópio óptico, coloca-se uma gota entre lamina e laminula, e no aumento de 100 ou 400X avalia-se o percentual de espermatozoides móveis (Nelson e Couto, 2015). O número de espermatozoides com motilidade para espécies canina varia de 80 a 90%, onde valores abaixo de 60% (astenozoospermia) devem ser considerados anormais (Silva et al., 2002). Sêmen canino fresco e congelado de qualidade aceitável deve apresentar  $\geq 70\%$  e  $\geq 50\%$  de motilidade, respectivamente (CBRA, 2013).

O vigor é caracterizado como a qualidade do movimento dos espermatozoides móveis (motilidade), em uma escala de 0 - 5 (Silva et al., 2003) ou de 1 - 5 (CBRA, 2013; Tabela 2), sendo, portanto, um parâmetro normalmente avaliado em conjunto com a motilidade. O vigor de espermatozoides caninos deve ser no mínimo 3, seja ele fresco ou congelado (CBRA, 2013).

A diminuição da intensidade dos movimentos em um sêmen considerado normal constitui um sinal de baixa temperatura e, uma nova amostra deve ser colocada em uma lâmina previamente aquecida e reavaliada. Movimentos anormais em sentido retrógrado ou em círculo estão muitas vezes relacionados a anormalidades morfológicas de peça intermediária e cauda (Johnson, 2006).

Tabela 2. Classificação do vigor da motilidade espermática.

Escore	Definição
5	Progressivo retilíneo muito rápido
4	Progressivo retilíneo rápido
3	Intermediário
2	Lento
1	Exclusivamente oscilatório

Fonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

### *Concentração espermática*

A concentração espermática é o número de espermatozoides por mililitro de sêmen. Tal parâmetro é avaliado na segunda fração, já que está é rica em espermatozoides. No cão, a concentração espermática fica em torno de  $247 \pm 9,9 \cdot 10^6$  espermatozoides por mL (Silva et al., 2002). Existem três formas para avaliação desse parâmetro, por espectrofotometria, método computadorizado ou a contagem de células realizada ao microscópio óptico ou de contraste com auxílio da câmara de Neubauer (CBRA, 2013).



Uma concentração espermática baixa (oligozoospermia) pode ser identificada em cães imaturos e geriátricos, bem como em casos de esgotamento das reservas extragonadais (epidídimo e ducto deferente) por excesso de coleta, e ainda por ejaculação retrógrada, quando parte do ejaculado flui para vesícula urinária. (Johnston et al., 2001). Azoospermia é a incapacidade de produzir ou ejacular espermatozoides (Johnson, 2006), coletando-se apenas plasma seminal. Alguns cães não ejaculam a segunda fração por ansiedade ou estimulação sexual insuficiente, especialmente na ausência de uma fêmea no cio (Memon, 2007).

### *Morfologia espermática*

A morfologia espermática é um parâmetro indispensável no espermograma, pois está intrinsecamente implicada a problemas na fertilidade tanto na espécie canina como em outras espécies animais, embora na espécie canina ainda não esteja clara essa relação (Oettlé, 1993). De todo modo, um baixo percentual de anormalidades espermáticas é preferível, uma vez que alterações morfológicas estariam relacionadas a uma diminuição na motilidade que consequentemente leva a uma diminuição na capacidade fertilizante por incapacidade de atingir o oócito (Krustritz, 2010).

Existem duas formas para se avaliar morfologia espermática, por esfregaço úmido e esfregaço corado. Para o esfregaço úmido, o sêmen é adicionado a um recipiente contendo solução formol-salina tamponado previamente aquecido, e então, coloca-se uma gota sobre a lâmina, cobrindo-a com lamínula. A análise deve ser realizada ao microscópio de contraste de fase. Já para o esfregaço corado, prepara-se um esfregaço espermático e deixa secar para corar. Diversos corantes são utilizados para sêmen canino: Eosina-nigrosina (CBRA, 2013), Diff-Quik (Johnston et al., 2001), Spermac® (Oettlé, 1993), Giemsa (Cardoso et al., 2003), Hematoxilina-eosina (Silva et al., 2003). Após a coradas, ao microscópio óptico, as células espermáticas devem ser examinadas a um aumento de 1000X, sob óleo de imersão contando um mínimo de 200 células, classificando-as em normais ou anormais (defeitos primários ou secundários) (CBRA, 2013). Para Johnston et al. (2001), um sêmen canino de qualidade aceitável deve apresentar um percentual mínimo de 80% de espermatozoides normais. Já para o CBRA (2013) tanto o fresco como congelado devem apresentar um mínimo de 70% de células normais.

As anormalidades morfológicas dos espermatozoides são divididas de acordo com sua localização em nível de: cabeça, peça intermediária e cauda (Johnson, 2006). Ademais, são classificadas em defeitos primários e secundários, sendo os primeiros relacionados à espermatogênese, exemplo: estruturas duplicadas, formas de cabeça anômalas, gota citoplasmática proximal; os secundários estão relacionados à maturação ou manipulação (iatrogênica), como nos casos de cabeça destacada, gota citoplasmática distal, cauda enrolada (Krustritz, 2010), peça intermediária quebrada e cauda destacada (Feldman e Nelson, 2004). Choque térmico, irregularidades no pH ou na osmolaridade representam causas iatrogênicas. Suspeita-se de causa iatrogênica quando observado um alto número de defeitos em peça intermediária ou cauda em amostra com motilidade normal (Johnson, 2006).

### *pH*

O pH da fração prostática do sêmen canino varia de 6,3 a 6,7 (Johnston et al., 2001; Silva et al., 2002).

### *Teste Hiposmótico*

O teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana do espermatozoide (Martinez, 2004), estrutura crucial no processo de fertilização (Chirinéa et al., 2003), uma vez que, a membrana plasmática está relacionada a mecanismos fisiológicos da manutenção da viabilidade espermática no trato reprodutor da fêmea, capacitação espermática e fertilização (Mocé e Graham, 2008). Referido como um teste simples e fácil (Mocé e Graham, 2008), além de barato quando realizado com água destilada, podendo ser utilizado com eficiência para avaliar espermatozoides frescos, refrigerados e congelados/descongelados (Quintela et al., 2010).

No teste hiposmótico, os espermatozoides são submetidos a uma solução hiposmótica e incubados. A cauda do espermatozoide parece ser particularmente sensível as condições hiposmóticas (Inamassu et al., 1999). Quando a membrana está funcional o espermatozoide sofre um processo de edemaciação e a cauda enrola, devido ao influxo de água aumentado na célula (Martinez, 2004). Algumas soluções hiposmóticas são relatadas na literatura, à base de citrato de sódio, frutose, sacarose (Pinto et al., 2005), e água destilada (Quintela et al., 2010). O tempo de incubação pode variar de 45 a 60 minutos em 37°C (Pinto et al., 2005), embora, Pinho e Kozink (2008) relatem que a incubação por 1 minuto para sêmen canino seja suficiente. Após o período de incubação, uma gota da suspensão é colocada entre lâmina e lamínula, e ao microscópio são contadas 200 células, em aumento de 400X. O resultado deve ser expresso em percentual de células com a cauda enrolada (espermatozoides com membrana funcional), e desse percentual, subtrai-se o percentual de células com a cauda enrolada previamente contadas no sêmen *in natura* (CBRA, 2013).



### *Integridade de membrana e acrossomo*

No cão, a integridade estrutural da membrana pode ser avaliada por microscopia fluorescente, utilizando vários corantes, como por exemplo: diacetato de carboxifluoresceína ou SYBR-14 combinado com iodeto de propídio (PI). De forma rotineira, essa análise é realizada em microscopia óptica com o corante eosina-nigrosina (Rijsselaere et al., 2005), entretanto, a microscopia óptica vem sendo substituída pela microscopia fluorescente (Peña et al., 2001), devido sua melhor eficiência.

O acrossomo do espermatozoide canino pode ser avaliado de forma rápida e fácil por microscopia óptica em esfregaços corados com eosina-nigrosina, giemsa, spermac®. Mais recentemente, tem sido utilizado lectinas associadas a corantes fluorescentes, como o isotiocianato de fluoresceína e a ficoeritrina (Rijsselaere et al., 2005).

A citometria de fluxo é um método à base de corantes fluorescentes que possibilita avaliar de forma objetiva a integridade da membrana espermática e do acrossomo do espermatozoide canino ao mesmo tempo, permitindo uma análise mais acurada do que os métodos convencionais. Esse método analisa mais de 10000 células em um pequeno espaço de tempo, número consideravelmente maior que 200 células usualmente analisadas ao microscópio (Peña et al., 2001).

### *Integridade da cromatina espermática*

A avaliação da integridade da cromatina do espermatozoide tem sido proposta como um parâmetro complementar a ser analisado com objetivo de assegurar uma melhor avaliação da qualidade espermática. (Evenson et al., 2002). A avaliação da integridade da cromatina espermática tem sido utilizada para justificar a infertilidade em homens com espermogramas normais (Giwercman et al., 2003), sendo essa infertilidade correlacionada a altos índices de DNA lesionado (Irvine et al., 2000). Hidalgo et al. (2015) citam dois métodos utilizados para avaliar a integridade da cromatina espermática canina, o teste de estrutura da cromatina espermática e teste de dispersão da cromatina espermática.

### *Capacitação espermática*

No trato reprodutivo da fêmea, o gameta masculino sofre uma série de alterações morfológicas em sua membrana plasmática, modificação ou remoção da cobertura protetora da membrana espermática. Este processo denominado capacitação, é necessário para que o espermatozoide seja capaz de fertilizar o oócito (Hafez e Hafez, 2004). A capacitação espermática pode ser avaliada usando substâncias como Clortetraciclina e Lectinas, e através da avaliação das características da motilidade por análise computadorizada (Petrunkina et al., 2004). Através da avaliação com Clortetraciclina, os espermatozoides são classificados em três categorias: não-capacitado com acrossomo intacto (cabeça do espermatozoide totalmente corada), capacitado com acrossomo intacto (cabeça do espermatozoide fortemente corada na região apical) e capacitado com acrossomo reagido (cabeça do espermatozoide levemente corada) (Hewitt et al., 1998).

## **Exames complementares**

### *Exames imaginológicos*

A ultrassonografia constitui um excelente método para avaliar testículos, epidídimos, cordão espermático e próstata, sendo indicada quando o exame físico revelar alguma anormalidade (Johnson, 2006). A radiografia é citada por Meyers-Wallen (1997) ser de grande utilidade para avaliação dos distúrbios prostáticos.

### *Biópsia*

Biopsias testiculares e prostáticas, por punção aspirativa com agulha fina podem ser facilmente realizadas guiadas por ultrassonografia, no entanto, deve ser realizado após os testes não invasivos. As amostras coletadas devem ser enviadas para análise citológica e cultura microbiológica (Johnson, 2006).

### *Exames microbiológicos*

A brucelose é uma doença de grande importância para a reprodução canina, testes para identificar infecção por *Brucella canis* são indicados para complementar o exame andrológico do reprodutor (Feldman e Nelson, 2004). Não há interesse em continuar avaliando a fertilidade de um cão positivo para brucelose, no entanto, a investigação epidemiológica é importante para o canil (Johnson, 2006).

Além da brucelose, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) cita outras doenças de importância à reprodução de cães, que podem ser transmitidas pelo sêmen fresco ou conservado (leptospirose, herpesvírose, leishmaniose e toxoplasmose) ou pela cópula (tumor de Sticker).



### *Dosagens hormonais*

Johnson (2006) cita a necessidade de avaliar os hormônios tireoidianos em cães diagnosticados inférteis. Feldman e Nelson (2004) aconselham a dosagem de testosterona no caso de perda de libido, bem como realizar dosagem dos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH), uma vez que agem diretamente nas funções reprodutivas do animal.

### *Dosagem de fosfatase alcalina no plasma seminal*

A dosagem de fosfatase alcalina no plasma seminal é utilizada para excluir a possibilidade de ejaculação incompleta em casos de oligozoospermia ou azoospermia. A segunda fração do ejaculado deve conter espermatozoides e alta concentração de fosfatase alcalina, uma vez que esta é produzida nos epidídimos. Em casos de azoospermia com alta concentração da fosfatase alcalina, existem duas possibilidades, insuficiência espermatogênica ou obstrução bilateral do fluxo dos testículos para epidídimos (Johnson, 2006).

### *Cariotipagem*

A investigação citogenética ou cariotipagem permite a identificação de padrões anormais nos cromossomos sexuais, responsáveis por anomalias congênitas (Johnston et al., 2001), porém não é comumente realizado na medicina veterinária.

## **Diagnóstico e emissão do laudo**

A partir da interpretação dos resultados coletados durante o exame, chega-se a um diagnóstico, e um laudo deve ser elaborado. O reprodutor pode ser classificado em apto, questionável ou inapto à reprodução. O laudo definitivo pode ser emitido em aproximadamente um mês, considerando o ciclo espermático da espécie (CBRA, 2013).

## **Criopreservação de sêmen**

Dentre as diferentes biotécnicas reprodutivas, a criopreservação de sêmen ainda merece destaque visto que possibilita um melhor aproveitamento de ejaculados oriundos de um mesmo reprodutor, bem como facilita a propagação deste material genético para diferentes regiões, possibilitando a manutenção da capacidade fecundante por um tempo indeterminado (Silva et al., 2001).

Os principais fatores que podem influenciar na sobrevivência espermática após a criopreservação são: propriedades osmóticas dos gametas, taxas de resfriamento e aquecimento e formação de cristais de gelo intracelular (Stănescu e Bîrțoiu, 2012). No entanto, outro fator de grande importância é o diluidor e seus componentes que poderá auxiliar em uma menor formação de cristais de gelo.

### *Diluidor*

Vários diluidores têm sido usados para a congelação de sêmen canino, dentre os quais podem ser citados: citrato (Harrop, 1962, apud Uchoa et al., 2012), leite desnatado (Uchoa et al, 2007), TRIS (Silva et al 2003), Lactose (Seager, 1969), Clone (Ström, 1997), Laiciphos 478®, o Biociphos W482® (Silva & Verstegen, 1995), e o diluente à base de água de coco in natura- DBAC (Cardoso et al.,2000) e em pó (ACP-106 e ACP-106c) (Cardoso et al., 2007;Uchoa, 2011).

### *Crioprotetores/protetores de resfriamento*

Nos meios de diluição para a criopreservação de sêmen, faz-se necessário o uso de substâncias crioprotetoras que protejam a célula espermática dos danos causados durante o equilíbrio, congelação e descongelação (Concannon & Battista, 1989).

Por vários anos o glicerol tem sido o crioprotetor mais utilizado em diversos protocolos para a criopreservação de sêmen canino. No entanto, observou-se em outras espécies como equinos e suínos, avanços com outros crioprotetores como amidas e hidroxitolueno butilato, respectivamente (Alvarenga et al. 2005, Roca et al. 2004).

Na congelação de sêmen canino, o glicerol também foi desafiado e crioprotetores como dimetilformamida, etilenoglicol, trealose e lipoproteínas de baixa densidade foram testados (Lopes et al., 2009).

Em relação à dimetilformamida, Lopes et al. (2009) observaram que não há uma significativa vantagem em substituir o glicerol pela mesma ao utilizar o diluidor Tris para congelação de sêmen de cão. Já comparando etilenoglicol e glicerol, Rota et al. (2006) observaram um efeito positivo do etilenoglicol sobre motilidade total e



motilidade progressiva até uma hora após o descongelamento, não sendo mais significativo após esse período. Avaliando a funcionalidade de membrana, os mesmos autores relataram não haver diferença até três horas após o descongelamento e, posteriormente, as amostras congeladas com etilenoglicol apresentaram um declínio maior.

Mota et al. (2009) também comparou glicerol e dimetilformamida para a congelação de sêmen canino usando o diluidor ACP-106c e concluíram que não há vantagem no uso do último para a criopreservação de sêmen nessa espécie.

A gema de ovo é considerada o protetor de resfriamento/crioprotetor não penetrante mais utilizado para criopreservação de espermatozoides de mamíferos, protege a membrana plasmática dos espermatozoides restaurando os fosfolípidios perdidos durante os processos de congelação e descongelação (Moussa et al., 2002). Pode ser usada no meio para sêmen canino na concentração de 20% (Silva et al., 2003). A gema de ovo contém lecitina que parece restituir esses fosfolípidios perdidos (Watson, 1995), bem como favorece a motilidade, pois tem a função de prevenir a rotação da cauda (Holt, 2000). Embora o mecanismo de proteção ainda não esteja totalmente esclarecido, alguns pesquisadores sugerem que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes na gema de ovo são as responsáveis pela proteção contra o choque térmico e melhoria da motilidade após a conservação. Apesar dos diversos componentes da gema de ovo que estão envolvidos na manutenção da integridade celular, a mesma é um componente de origem biológica que oferece riscos. Em substituição à gema de ovo, pode-se usar as LDL e hidroxitolueno butilato (BHT). As LDL quando associado a um aminoácido, a glutamina, apresentou bons resultados durante a criopreservação de espermatozoides caninos. A associação de 6% de LDL com 20 mmol de glutamina trouxe uma melhor motilidade e proteção, sendo ainda superior ao Equex STM. Ademais, além de uma melhor proteção, as LDL associado a glutamina é muito mais fácil de ser utilizado quando comparado ao Equex STM que requer sucessivas diluições (Bencharif et al., 2012). Bencharif et al. (2012) afirmam que a associação dessas substâncias poderia ser comercializada, uma vez que requer menor manipulação, reduzindo o risco de contaminação bacteriana. Apesar de ter sido observado que a gema de ovo inteira como um soro possui componentes que podem inibir a motilidade e alterar a morfologia acrossomal (Farstad, 2009), as LDL mostraram efeito positivo na fertilidade do espermatozoide do cão (Bencharif et al. 2006, apud Farstad, 2009)

#### *Antioxidantes*

Muito progresso ainda precisa ser alcançado no que diz respeito à criopreservação de sêmen de cães, e uma das possíveis causas seja o estresse oxidativo sofrido pelas células espermáticas, podendo levar à perda da capacidade fertilizante (Lopes, 2010). Brevemente, o metabolismo espermático produz substâncias oxidantes (espécies reativas ao oxigênio-ROS), que causam danos à membrana espermática, diminuindo a motilidade e a viabilidade espermática (Amann e Grahan, 1993, apud Lopes, 2010). As substâncias capazes de neutralizar tais oxidantes são chamadas de antioxidantes, restabelecendo o equilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes, mantendo a integridade das membranas celulares, prevenindo danos ao DNA (Agarwal e Saleh, 2002). O controle do nível das espécies reativas de oxigênio pela inclusão de antioxidantes ou pelo uso de condições que reduzam a oxidação durante a congelação tem sido descrito (Bilodeau et al., 2002).

Lopes (2010) relata que a adição de antioxidante no meio de congelação não influenciou os resultados quando se utilizou sêmen de cães férteis. No entanto, no grupo de animais subfêrteis, houve efeito positivo da superóxidodismutase (SOD) e associação de SOD e catalase sobre as características de velocidade do sêmen.

Silva et al. (2012) observou uma melhor motilidade total ao adicionar o antioxidante hidroxitolueno butilato (BHT) na concentração de 2mM ao diluidor ACP-106c® em comparação ao mesmo diluidor sem o antioxidante.

#### *Velocidade de congelação/dcongelação*

Mazur et al. (1972, apud Stănescu e Birțoiu, 2012) foram os primeiros a levar em consideração que tanto velocidades de congelação muito rápidas ou muito lentas estão associadas a crioinjúrias. Os protocolos de congelação dependem do diluidor utilizado, crioprotetores e protetores de resfriamento.

Antes de ser congelado, os espermatozoides são resfriados a 4°C e mantidos nesta temperatura por um período variável, resultando em diversos protocolos que variam de 1 a 4 horas, geralmente (Songsasen et al., 2002; Yu et al., 2002). Várias velocidades de congelação foram testadas para sêmen canino e considera-se que uma taxa de 10 a 50°C/minuto na fase de -15°C/-60°C seria considerada ótima (Olar et al., 1989; Rota et al., 1998; Peña & Linde-Forsberg, 2000); Hay et al. (1997) comparou uma taxa muito rápida (-99°C/min) com uma muito lenta (-0,5°C/min) e ambas proporcionaram efeitos deletérios, ao passo que taxas de -12°C/min e -28°C/min proporcionou bons resultados. Para a congelação, a mesma pode ser realizada tanto em caixas de isotérmicas colocando-se as palhetas em diferentes distâncias do nível de nitrogênio líquido ou em congeladores programáveis. Congeladores assistidos por computador, apesar de mais caros, mostrou uma melhora na longevidade espermática e na motilidade progressiva por proporcionar uma curva de resfriamento em duas etapas, com uma diminuição mais rápida da temperatura durante a primeira etapa do que a obtida com uma caixa





de isopor (Songsasen et al., 2002, Schäfer-Somi et al., 2006).

Acipreste (2006) relata que a temperatura sob a qual se descongela uma amostra de sêmen desempenha influência direta sobre a viabilidade espermática no pós-descongelamento e ainda relatou que também existem vários protocolos de diferentes temperaturas e velocidades de descongelamento para o sêmen canino. De modo geral, o descongelamento pode ser realizado pelo processo lento que seria a temperatura de 37°C por 1 minuto (Silva et al., 1998) ou pelo processo rápido que seria a temperatura de 75°C por 7 segundos (Pena et al., 1998). Uchoa et al. (2012) afirmaram que por razões práticas o sêmen congelado de cães é frequentemente descongelado a 37 °C. O congelamento e o descongelamento devem seguir o mesmo padrão de velocidade, ou seja, quando o congelamento é realizado sob processo rápido o descongelamento também deve proceder de acordo e, quando o protocolo de congelamento for lento a descongelamento também deve ser lento (Strom et al., 1997). A descongelação é uma etapa onde pode causar intensa morte celular, pois pode levar à recristalização do gelo intracelular e estresse hipotônico (Holt et al., 1994; Gilmore et al., 1996). Após a descongelação, pode-se realizar uma diluição, onde um possível efeito benéfico seria reduzir os efeitos tóxicos do crioprotetor.

#### *Fatores inerentes aos animais*

Cães machos podem ter uma sensibilidade diferente ao processo de congelamento (Rota et al., 2005). Além disso, já foi observado um declínio na fertilidade em cães relacionado com a idade ao usar sêmen congelado (Thomassen et al. 2006).

Diferenças de fertilidade entre cães, muitas vezes, podem ser compensadas com o aumento da dose inseminante, mas ao se alcançar o máximo da fertilidade de um reprodutor, o número de espermatozoides não resulta mais em compensação. Tais problemas estão relacionados com espermatozoides que apresentam capacidade fertilizante, mas não suportam o desenvolvimento embrionário (Saacke et al. 2000), podendo ser ocasionado por danos na estrutura do DNA, não impedindo a fecundação, mas necessário a desenvolvimento do embrião (Aitken and Baker 2004; Fatehi et al. 2006). Se tais alterações pudessem ser avaliadas antes e após a congelação do sêmen, talvez fosse possível prever a capacidade fertilizante de determinadas amostras de sêmen (Waterhouse et al. 2006; Al Haider 2007, apud Farstad, 2009).

#### *Modificações no protocolo de congelação*

Muitas vezes não é possível congelar amostras seminais imediatamente após a coleta pelo fato de não ter a estrutura laboratorial adequada. Além disso, apesar da congelação de sêmen ser uma biotécnica relativamente comum, ainda apresenta limitações quanto ao envio de material armazenado em nitrogênio líquido (-196°C) por via aérea devido a regulamentações específicas. Dessa forma, o envio de sêmen refrigerado seria mais fácil.

Pensando nisso, Santana et al. (2013) testaram diferentes tempos de estocagem prévia ao armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) e observaram que o armazenamento na forma resfriada (4°C), antes do congelamento, por até dois dias não diminuiu a qualidade espermática.

Uma outra modificação seria no armazenamento. Geralmente, armazena-se o sêmen congelado em botijões criogênicos a -196°C. A estocagem em *dryshipper* mantém uma fase de vapor (-150°C) por alguns dias sem o risco de derramar nitrogênio líquido durante o transporte (Bielanski, 2005; Hendricks et al., 2010). Batista et al. (2012) observou que o *dryshipper* foi eficaz em preservar sêmen de cão por até sete dias.

Apesar do sêmen canino ser ejaculado em frações e a sua separação ser um processo relativamente fácil, ainda pode haver a mistura de frações e a centrifugação resolveria tal problema, promovendo também a concentração dos espermatozoides (Rijsselaere et al., 2002, Verstegen et al., 2005). Em algumas espécies, o contato prolongado dos espermatozoides com plasma seminal é associado à queda da motilidade e viabilidade espermática (Aurich, 2005 apud Mascarenhas, 2008). Vários protocolos foram testados para a centrifugação do sêmen canino, mas os resultados ainda são controversos.

#### *Taxas de fertilidade com uso do sêmen canino congelado*

As taxas de sucesso com sêmen congelado na espécie canina ainda são um pouco mais baixas que em outras espécies, variando de 30 a 60% para inseminação intravaginal e de 50 a 80% para inseminação intrauterina (Mascarenhas, 2008).

Thomassen et al. (2006) fazendo um estudo retrospectivo de 20 anos com o uso do sêmen canino congelado, relatou uma taxa de sucesso de 75%, mas fazendo uso da técnica transcervical. Em um pequeno número de cadelas (n=20) foi realizada a técnica de deposição do sêmen na vagina, observando-se uma taxa de fertilidade de 10% apenas.

Santos (2012) comparou a fertilidade do sêmen fresco com o sêmen congelado utilizando a inseminação por laparotomia e observou uma taxa de 78,6% para sêmen congelado e 94,74% para sêmen fresco.



### Considerações finais

A avaliação andrológica é uma etapa essencial no processo de criopreservação de sêmen, visto que a amostra seminal precisa ser avaliada previamente ao congelamento. É essencial que se use amostras de qualidade, uma vez que a congelação causa danos. Há vários protocolos para a congelação de sêmen canino, com uma variedade de resultados. Tal fato pode ser devido à grande variação individual, com ejaculados que não apresentam uma boa congelabilidade, devendo-se investigar protocolos individuais para tais amostras.

Além disso, um outro problema na espécie canina trata-se do pequeno volume da fração espermática com uma concentração mais baixa quando comparado a espécies como caprinos e ovinos, o que limita a utilização na avaliação de vários parâmetros e protocolos ao mesmo tempo.

Dessa forma, há uma crescente demanda por profissionais que trabalhem com biotécnicas de reprodução assistida na espécie canina. Tais profissionais necessitam, por exemplo, avaliar de forma mais acurada o sêmen identificando estruturalmente as subpopulações espermáticas que possam ajudar a identificar as diferenças na congelabilidade entre ejaculados. A padronização de diluidores que atendam sêmen com boa e com baixa congelabilidade poderá ajudar a identificar problemas na fertilidade que estejam relacionados aos meios diluidores utilizados.

### Referências

- Acipreste AC.** Criopreservação de sêmen canino, utilizando associações de crioprotetores e dois protocolos de descongelamento. 2006. 59f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2006.
- Agarwal A, Saleh RA.** Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am*, v. 29, p.817-27, 2002.
- Agarwal A, Sharma RK, Nelson DRN.** New sêmen quality scores developed by principal component analysis of sêmen characteristics. *J Androl*, v. 24, 2003.
- Aitken RJ, Baker MA.** Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.581-588, 2004.
- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL.** Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci*, v.89, p. 105-113, 2005.
- Batista M, Santana M, Niño T, Alamo D, Cabrera F, González F, Gracia A.** Sperm viability of canine and caprine semen samples preserved in a dry shipper. *Anim Reprod Sci*, v.130, p.105-110, 2012.
- Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D.** 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 sêmen. *Res Vet Sci*, v.93, p.440-447, 2012.
- Bielanski A.** Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens. *Theriogenology*, v.63, p.1946-1957, 2005.
- Bilodeau JP, Blanchette S, Cormier N, Sirard MA.** Reactive Oxygen Species-Mediated Loss of Bovine Sperm Motility in Egg Yolk Tris Extender: Protection by Pyruvate, Metal Chelators and Bovine Liver or Oviductal Fluid Catalase *Theriogenology*, v.57, p.1105-1122, 2002.
- Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM.** Congelamento do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. *Ciênc Anim*, v.10, p.29-36, 2000.
- Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM.** Determinação da concentração espermática no sêmen de cães Pastores Alemães através da espectrofotometria. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.384-386, 2003.
- Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM, Chirinéa VH, Souza FF Lopes MD.** Evaluation of Fertilizing Potential of Frozen-thawed dog Spermatozoa Diluted in ACP-106 using an *In vitro* Sperm-Oocyte Interaction Assay. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.11-16, 2007.
- Chirinéa VH, Martins MIM, Souza FF, Tebet JM, Lopes MD, Trinca LA.** Efeito da suplementação de diferentes açúcares no meio de congelação de sêmen de cães. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.361-363, 2003.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- Concannon PW, Battista M.** Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk RW (ed), *Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1989. p.1247-1259.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK.** Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*, v.23, p.25-43, 2002.
- Farstad W.** Cryopreservation of Canine Semen – New Challenges. *Reprod Dom Anim*, v.44, p.336-341, 2009.
- Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen B A J, Colenbrander B, Gadella BM.** DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first



cleavages. *J Androl*, v.27, p.176-188, 2006.

**Feldman EC, Nelson RW.** Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 3ª edição, Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. p.930-1010.

**Gilmore JA, Du J, Tao J, Peter AT, Critser JK.** Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J Reprod Fert*, v.107, p.87-95, 1996.

**Giwereman A, Richithoff J, Hjollund H, Bonde JP, Jepson K Frohm B, Froham B, Spano M.** Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril*, v.80, p.1404-1412, 2003.

**Hafez ESE, Hafez B.** Reprodução animal. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 3-12; 97-126

**Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL.** Canine spermatozoa - Cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, v. 48, p. 1329 - 1342, 1997.

**Hendricks KE, Penfold LM, Evenson DP, Kaproth MT, Hansen PJ.** Effects of airport careening X-irradiation on bovine sperm chromatin integrity and embryo development. *Theriogenology*, v.73, p.267-272, 2010.

**Silva HVR, Mota Filho AC, Freire LMP, Pinto JN, Nunes TGP, Silva LDM.** Adição do BHT ao diluidor ACP-106c para a criopreservação do sêmen canino. *Ciênc Anim Suplemento*, p.513-515, 2012.

**Hewitt DA, England GCW.** An investigation of capacitation and the acrossome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Anim Reprod Sci*, v.51, p.321-332, 1998.

**Hidalgo M, Urbano M, Ortiz I, Demyda-Peyras S, Murabito M R, Gálvez M J, Dorado J.** DNA integrity of canine spermatozoa during chill storage assessed by the sperm chromatin dispersion test using bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology*, v.84, p.399-405, 2015.

**Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.3-22, 2000.

**Holt WV, North RD.** Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damaged in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol Reprod*, v.51, p.414-424, 1994.

**Inamassu A, Uechi E, Lopes MD.** Viabilização do teste hiposmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.23, p.302-304, 1999.

**Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ.** DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*, v.21, p.33-34, 2000. Abstract.

**Johnson C.** Conceitos atuais sobre infertilidade no cão. *Waltham Focus*. v.16, p.7-12, 2006.

**Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS.** Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001, 592p.

**Lopes KRF, Costa LLM, Lima GL, Souza ALP, Silva AR.** imethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, v.72, p.650-654, 2009.

**Krustritz MV.** Clinical canine and feline reproduction: Evidence based answers. 1ª edição, Iowa, EUA, editora Offece. 2010. p.25-27; 29-33.

**Lopes BV.** Efeito da adição e /ou suplementação de antioxidante no processo de congelamento/descongelamento de sêmen de cães férteis e subférteis, 2010. 102p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 2010.

**Mascarenhas MR.** Avaliação individual e racial da qualidade do sêmen canino "in natura" e criopreservado em diferentes protocolos. 2008, 72p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2016.

**Martinez ALP.** Canine fresh and cryopreserved sêmen evaluation. *Anim Reprod Sci*, v.82, p.209-24, 2004.

**Memon MA.** Common causes of male dog infertility. *Theriogenology*, v.68, p.322-328. 2007.

**Meyers-Wallen VN.** Análise do sêmen, inseminação artificial, e infertilidade no cão macho In: Ettinger, S.J; Feldman, E. C. Tratado de medicina interna veterinária. 1ª edição: Manole, 1997. v.2 p.2275-2293.

**Mocé E, Graham JK.** *In vitro* evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci*, v.105, p.104-118, 2008.

**Lopes KRF Costa LLM Lima GL Souza ALP Silva AR.** Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, v.72, p.650-654, 2009.

**Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M.** Low density lipoproteins extracted from egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695-1706, 2002.

**Nelson RW, Couto CG.** Medicina interna de pequenos animais, 5ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 905-907.

**Oettlé EE.** Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil Suppl*, v.47, p.257-260, 1993.

**Olar TT, Bowen RA Pickett BW.** Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post thaw motility on canine spermatozoa frozen in straws, *Theriogenology*, v.31, p.451-461, 1989.

**Peña AI, Barrio F, Quintela LA, Herradón PG.** Effect of glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevit and acrossomal integrity. *Theriogenology*, v.50, p.163-174, 1998.

**Peña AI.** Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelacion descongelacion. Lugo, 1997. 329p. Tese (Doutorado) - Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha, 1997.

**Peña AI, Johannisson A, Linde-Forsberg C.** Validation of flow cytometry for assessment of viability and



- acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *J Reprod Fertil.* v. 57 p. 71-376, 2001.
- Peña AI, Linde-Forsberg C.** Effects of Equex, one- or two- steps dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.53, p.859-875.2000.
- Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E.** Kinetics of protein tyrosine phosphorylation in sperm selected by binding to homologous and heterologous oviductal explants: how specific is the regulation by the oviduct? *Theriogenology*, v.61, p.1617-1634, 2004.
- Pinho CRF, Kozink DM.** Simplified hypoosmotic swellig test (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.450-55, 2008.
- Pinto CRF, Wrench N, Schramme A.** Simplified hypo-osmotic testing of canine spermatozoa. *Theriogenology*, v.65, p.811, 2005
- Quintela AT, Oliveira IRS, Souza AO, Gusmão AL, Silva AR.** Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. *Anim Reprod*, v.7, p.70-74, 2010.
- Rijsselaere T, Van M A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, De Kruif A.** New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*, v.64, p.706-19, 2005.
- Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parilla I, Vasquez JM, Martinez EA.** Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J Androl*, v.25, p.397-405, 2004.
- Romagnoli S, Schlafer DH.** Disorders of sexual differentiation in puppies and kittens: diagnostic and clinical approach. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v.36, p.573-606, 2006.
- Rota A, Linde-Forsberg C, Vanzozi I, Romagnoli S, Rodriguez-Martinez H.** Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing-thawing rates. *Reprod Dom Anim*, v.33, p.355-361, 1998.
- Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M.** Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, v.65, p.1848-1858, 2006.
- Rota A, Rota A, Martine M, Milani C, Romagnoli S.** Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod Nutr Dev*, v.45, p.29-37, 2005.
- Saacke RG, Dalton JC, Nadir S, Nebel RL, Bame JH.** Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.663-677, 2000.
- Santana M, Batista M, Alamo D, González F, Niño T, Cabrera F, Gracia A.** Influence of Cool Storage before Freezing on the Quality of Frozen-Thawed Semen Samples in Dogs. *Reprod Domest Anim*, v.48, p.165-70, 2013.
- Santos CS.** Inseminação Artificial: a fertilidade do sêmen canino congelado, comparado à do sêmen fresco. Monografia (Graduação em medicina veterinária). 2012. 21p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- Schäfer-Somi S, Kluger S, Knapp E, Klein D, Aurich C.** Effects of semen extender and semen processing on motility and membrane integrity of frozen-thawed dog spermatozoa, *Theriogenology*, v.66, p.173-82, 2006.
- Seager SWJ.** Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *Artificial Insemination Digest*, p.17-26, 1969.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores a base de Tris e água de coco. *Ciênc Rural*, v.6, p.1021-1025, 2000.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Criopreservação do sêmen canino: Revisão. *Ciênc Anim*, v.11, n.2, p.119-129, 2001
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Efeito do processo de descongelamento sobre a viabilidade do sêmen canino *in vitro*. *Ciênc Anim*, v.8, p.75-80, 1998.
- Silva AR.** Avaliação andrológica de cães e gatos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.5, p.52-55, 2002.
- Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM.** Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, v.59, p.821-829, 2003.
- Silva LDM, Verstegen JP.** Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v.44, p.571-579, 1995.
- Silva LDM, Silva AR, Cardoso RCS.** Inseminação artificial em cães. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Editora Varela, 2002. p.69-95.
- Songsasen N, Yu I, Murton S, Paccamonti DL, Eilts B E, Godke RA, Leibo SP.** Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology*, v.44, p. 79-90, 2002.
- Souza FF.** Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino. 2003. 98p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2003.
- Stanescu M, Birțoiu AI.** Freezing of dog's sperm: a review. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 17, p.7709-7716, 2012.
- 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.
- Thomassen R, Sanson G, Krogenæs A, Fougner JA, Andersen BK, Farstad W.** Artificial insemination with



frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology*, v.66, p.1645-1650, 2006.

**Uchoa DC, Silva TFP, Mota Filho AC, Silva LDM.** Criopreservação de Sêmen e Inseminação Artificial em Cães. *Ciênc Anim, Fortaleza*, v.1, p.132-142, 2012.

**Verstegen JP, Onclin K, Iguer-Ouada M.** Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: *in vitro* and *in vivo* studies. *Theriogenology*, v.64, p.720-733, 2005.

**Waterhouse KE, Haugan T, Kommisrud E, Tverdal A, Flatberg G, Farstad W, Evenson DP, De Angelis PM.** Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reprod Fertil Dev*, v.18, p.781-788, 2006.

**Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.

**Yu I, Songsasen N, Godke RA, Leibo SL.** Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*, v.44, p.62-78, 2002.

---