

Estado da arte de diluidores para refrigeração e congelamento do sêmen de cães *State of the art of extenders for refrigerating and freezing dog semen*

Silvia Edelweiss Crusco^{1,2*}

¹UNIP, ²ANCLIVEPA-SP

Resumo

A refrigeração e a congelamento do sêmen são biotecnologias responsáveis por manter a viabilidade do sêmen por períodos mais longos desde a sua coleta até a futura utilização. Os processos de manipulação e armazenamento de espermatozoides podem induzir alterações na superfície espermática, afetando sua estabilidade e qualidade. Os diluidores, são os responsáveis pelo aumento de volume do sêmen e pela proteção e preservação dos espermatozoides nestes processos. O objetivo desse trabalho é avaliar os diluidores e as biotecnologias aplicadas ao sêmen envolvendo desde a coleta, avaliação espermática, protocolos de refrigeração, congelamento, armazenamento e descongelamento do sêmen.

Palavras-chave: sêmen, cães, resfriamento, congelamento, diluidores

Abstract

Cooling and freezing of semen are biotechnologies responsible for maintaining the viability of semen for longer periods from collection to future use. The processes of handling and storing sperm can induce changes in sperm surface, affecting its stability and quality. Diluents are responsible for increasing semen volume and protecting and preserving sperm in these processes. The aim of this work is to evaluate diluents and biotechnologies applied to semen, involving collection, sperm evaluation, cooling protocols, freezing, storage, and semen thawing.

Keywords: semen, dogs, cooling, freezing, extender

Introdução e breve histórico

A utilização de biotecnologias aplicadas ao sêmen de cães inclui a utilização do sêmen diluído, refrigerado e congelado (Payan-Carreira et al., 2011). A preservação do sêmen por refrigeração e posterior armazenamento é uma biotecnologia muito utilizada no manejo reprodutivo de cães. Vários trabalhos têm sido realizados objetivando a busca de um diluidor para resfriar e congelar o sêmen de cães. A primeira utilização bem-sucedida relatada de sêmen refrigerado em cães data de 1954 (Harrop, 1954). O primeiro relato de criopreservação de sêmen de cães data de 1954 (Rowson, 1954). Em 1964 houve a primeira comparação publicada com diferentes diluidores na congelamento do sêmen de cães, a partir de então, várias pesquisas ainda são feitas para avaliar os níveis de crioprotetor, os métodos de congelamento e os tipos de diluidores (Foote, 1964). O primeiro nascimento de uma ninhada proveniente de inseminação em cães utilizando sêmen congelado foi descrita por Seager em 1969 (Flenden, 1971). No Brasil, a primeira publicação sobre sêmen congelado de cães foi no final dos anos 90 (Santos et al., 1999).

Coleta do sêmen

A coleta do sêmen é o passo inicial para a aplicação futura das biotecnologias. A manipulação digital do pênis é o principal método de coleta do sêmen de cães (Mason, 2018). O sêmen de cães também pode ser colhido dos epidídimos por aspiração dos epidídimos. (Lopes et al., 2020; Hassan, 2023). A colheita farmacológica também pode ser realizada utilizando agentes α -adrenérgicos (Kuczmarski et al., 2020).

Análise do sêmen nos momentos pré e pós refrigeração e congelamento

A avaliação do sêmen deve incluir análise de parâmetros cinéticos, concentração da morfologia espermática. Considera-se que a amostra de sêmen ideal para se iniciar o processo de refrigeração e congelamento tenha >70% de motilidade espermática retilínea, vigor espermático entre 3-4 (0-5), < 20% de

*Correspondência: silviacrusco@terra.com.br

Recebido: 29 de abril de 2023

Aceito: 25 de maio de 2023

alterações de morfologia e concentração acima de 200×10^6 ml (adaptado de BRA, 2013). A análise dos parâmetros seminais pode prever o sucesso do diluidor utilizado para refrigeração e a criopreservação (Christensen e Meyers, 2023). Outros parâmetros podem ser avaliados antes e após a utilização dos diluidores podem ser avaliados como teste hiposmótico, sondas fluorescentes para avaliar a integridade da membrana espermática, teste de ligação do espermatozoide à membrana perivitelina da gema de ovo e análise proteômica do plasma seminal (Araujo et al., 2008, Cavalcanti et al., 2023).

Refrigeração

Diluidores e sêmen refrigerado

O uso de sêmen refrigerado tornou-se uma prática comum no manejo reprodutivo de cães. As principais vantagens do uso de sêmen refrigerado incluem: a facilidade de processamento e envio, baixo custo do procedimento, porque não é necessário nenhum equipamento especial para tal. As taxas de prenhez e o tamanho da ninhada são maiores em comparação com aqueles para sêmen congelado descongelado quando métodos igualmente bons para o momento do ciclo estral e IA são usados (Fosberg, 1995). No entanto, a longevidade dos espermatozoides resfriados é limitada em comparação à qualidade inicial do sêmen (Goericke-Pesch et al., 2012). Os espermatozoides caninos podem ser resfriados e armazenados por 96 horas a 5 °C em um diluidor de Tris-frutose com 20% de gema de ovo usando taxas de resfriamento rápidas, com valores de qualidade espermática semelhantes aos de um protocolo convencional (Rodenas et al., 2014). Diversos diluidores comerciais e não comerciais tem sido utilizados para refrigeração de sêmen de cães como: Tris-gema, Botudog®, Minitube®, INRA®, Uppsala (Peña et al., 2006; Goericke-Pesch et al, 2012; Lima et al.; 2019; Cavalcanti et al., 2023).

Protocolo básico da refrigeração

A fração rica do espermatozoide é colhida, analisada e pode ou não ser centrifugada (700g x 8 minutos). O diluidor próprio para resfriamento é adicionado na proporção 1:1 – 1:4 (conforme concentração espermática da análise), o sêmen é acondicionado em tubo com tampa de rosca ou em recipiente próprio. Após a diluição ele deve permanecer a 5° C para estabilização na geladeira ou em caixa própria para ser feita curva de refrigeração e posterior envio do sêmen (protocolo do autor; Peña, 2006; Randall, 2020). Para manter uma temperatura de refrigeração (5° C), a maioria das caixas de isopor comerciais de transporte de sêmen são revestidas com espuma de poliestireno extrudado e usam 1 ou 2 placas de gelo biológico que precisarão ser congelados antes do envio. Deve-se garantir que o sêmen resfriado não entre em contacto direto com as placas de gelo (Randall, 2020). Existem caixas próprias para transporte de sêmen resfriado que geram 2 curvas de temperatura: uma a 15°C (utilizando 1 gelo) ou 5°C (utilizando 2 gelos), sendo a amostra para ter viabilidade de até 12 horas usar 1 e acima de 12 horas sempre usar 2 gelos (Botuflex®, 2024). Parâmetros morfofuncionais de amostras de sêmen colhidas e mantidas em refrigeração e depois submetidas ao processo de congelamento permaneceram comparáveis entre as amostras congeladas após a coleta ou após 24/48 h de transporte, portanto, a congelamento após o transporte resfriado é uma boa opção para evitar o estresse animal e promover uma maior difusão da criopreservação do sêmen, facilitando a oportunidade de criopreservação do sêmen para criadores que não possuem por perto uma clínica de reprodução (Christensen e Meyers, 2023; Colombo et al., 2022). Foi demonstrado que o sêmen pode ser processado em concentrações mais altas de espermatozoides, como 200×10^6 espermatozoides/mL imediatamente após a coleta ou diluído 1:3 sem centrifugação do ejaculado, refrigerado por 24h, centrifugado novamente e o pellet diluído (Sugai et al., 2024).

Congelamento

Diluidores e sêmen congelado

Estudos são dedicados a formulação de diluidores com diferentes tipos de crioprotetores como a adição de 6% de lipoproteína de baixa densidade (LDL) ao invés da gema de ovo (EY), 1% de lecitina de soja tipo IV-S em vez de EY, dimetilformamida (DMF) em vez de glicerol e alguns outros aditivos para diluidores como metformina, ergotioneína e 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) (Bencharif e col., 2010). O diluidor com crioprotetor para congelamento de sêmen deve ter uma osmolaridade e pH semelhantes em comparação com o plasma seminal para permitir a sobrevivência dos espermatozoides (Bencharif e Dordas-Perpinya, 2020). Inicialmente, o sêmen canino foi diluído em leite desnatado, posteriormente foram

desenvolvidos diluidores à base de Tris e frutose, cuja ação, ao reduzir o metabolismo, preservaram a motilidade espermática. A água de coco em pó também tem sido utilizada como diluidor, sendo composta por uma mistura de proteínas, sais, açúcares, vitaminas, aminoácidos e fatores de crescimento. A morfologia espermática parece não se degradar significativamente pelo processo de congelamento/descongelamento, independentemente do tipo de diluidor utilizado (Christensen e Meyers, 2023). Em uma recente revisão sobre os diversos crioprotetores para sêmen humano, os resultados indicaram que o glicerol é o agente crioprotetor mais utilizado, geralmente incorporado a uma solução salina balanceada contendo substratos energéticos, tampões, osmólitos e proteínas na forma de albumina sérica humana ou leite desnatado (animal) (Hungerford et al., 2022). A maioria das formulações dos diluidores utiliza a concentração de 20% de gema como padrão (Peña et al., 2026). A gema de ovo é um constituinte básico de vários tipos de diluidores utilizados para cães e outros animais. A gema de ovo protege a membrana do espermatozoide contra os choques térmicos e previne ou recupera a perda de fosfolípidios da membrana. Ela tem sido amplamente utilizada em preservação do sêmen por ser um complexo biológico que contém proteínas, vitaminas, fosfolípidos, glicose e antioxidantes que são todos protetores de membrana (Farstad, 2009). Foram comparados o uso de plasma de gema de ovo (EYP) em vez de gema de ovo (EY) adicionada a pasta Equex STM baseado em diluidor TRIS para congelamento de sêmen de cães e também foi testada se a adição de lecitina e catalase onde o diluidor a base de gema de ovo foi superior aos outros mesmo com a adição de lecitina e catalase no diluidor com plasma de gema de ovo (Schäfer-Somi et al., 2021). A fórmula base para congelamento de cães é: Tris 3,025g, Ácido Cítrico 1,7 g, Frutose 1,25g, estreptomicina 0,1g, benzilpenicilina 0,06, glicerol 7ml, Equex ST Paste® 1 ml, Gema de Ovo 20 ml, Água Destilada qsp 72 ml e ao final pH 7 e osmolaridade de 1498 mOsm. Para resfriamento basta não adicionar o glicerol na preparação e o diluidor terá pH 6,5 e osmolaridade de 1431 mOsm (Schäfer-Somi et al., 2021). Também existem diluidores comerciais para congelamento de sêmen de cães como exemplo: Botudog Freezing® e CaniPlus Freeze®

Protocolos básicos de congelamento

O número de doses inseminantes por ejaculado utilizando o sêmen congelado, antes então limitante, pode ser aumentado submetendo os cães a uma dupla coleta de sêmen com intervalo de 1 hora. Os dois ejaculados foram combinados para criopreservação mantendo o comportamento na congelamento/descongelamento (Wanasek et al., 2021). Após a coleta, o ejaculado é centrifugado (300 - 700 x g por 5 - 6 minutos) para eliminar parte da primeira ou terceira fração e, o sobrenadante é retirado e adicionado ao pellet diluente (a uma temperatura semelhante à do sêmen) (Randall, 2020). A centrifugação resulta em uma taxa de recuperação de apenas 75% dos espermatozoides obtidos na coleta de sêmen (Aurich, 2008). A maioria dos extensores comerciais recomenda uma diluição de 1 parte de sêmen para 4 partes de diluidor. O sêmen pode ser envasado em palhetas de capacidade de 0,5 ml ou 0,25 ml, criotubos ou pellets. Comparando-se o envase em palhetas, um trabalho demonstrou que envasar e congelar o sêmen em palhetas de 0,5 ml resultou em 5,7% mais espermatozoides progressivamente móveis 60 min após a descongelamento e 6,5% menos acrossomas anormais do que palhetas de 0,25 mL ($P < 0,05$ n = 64) (Nöthling e Shuttleworth, 2005). A dose de inseminação deve conter pelo menos 150 a 200×10^6 espermatozoides (Hollinshead e Hanlon, 2017). O protocolo de congelamento do sêmen varia conforme o tipo de diluidor utilizado e recomendações do fabricante do diluidor comercial em questão. Tradicionalmente ele pode ser feito pelo processo lento, no qual primeiro o sêmen será adicionado da fração de diluidor sem crioprotetor (na mesma temperatura do sêmen), mantido em refrigeração por 60 minutos a 5 °C e após estabilização de 60 minutos, o diluidor contendo o crioprotetor é adicionado e há uma nova etapa de 60 min em refrigeração a 5 °C. Depois, o sêmen é envasado nas palhetas, acondicionado nas racks e submetido a um banho de vapor de nitrogênio (-70 °C) por 20 minutos e finalmente armazenado em botijão de nitrogênio (Brito et al., 2016). O processo pode ser rápido, no qual o diluidor a ser adicionado ao sêmen já possui o crioprotetor e irá para refrigeração (5°C) por 120 minutos e depois será submetido ao banho no vapor de nitrogênio e imerso em nitrogênio líquido. O sêmen será envasado em palhetas previamente identificadas (protocolo da rotina do autor; Santos et al., 1999; Peña et al., 2006; Randall, 2020). Os diluidores mais utilizados para congelamento de sêmen de cão são Tris-gema-equex, Botudog®, Minitube®, Uppsala-equex (Peña et al., 2006; Goericke-Pesch et al., 2012; Schafer-Somi et al., 2021).

Descongelamento

A descongelamento das amostras pode ser realizada a 37°C por 1 minuto (Moura et al., 2013) ou a 70°C por 8 segundos (Linde-Forsberg 1991, Peña et al., 2006). Foi descrito que a descongelamento em banho maria a 70°C mostrou uma média de 6,6% a menos de anormalidades acrossômicas do que o sêmen

descongelado a 37°C (Nöthling e Shuttleworth, 2005). Independentemente do processo de congelamento, o protocolo de descongelamento lento pode ser recomendado para a criopreservação em larga escala de sêmen canino, uma vez que apresenta um melhor resultado funcional consistente (Brito et al., 2016).

Diluidores para cães bons e maus congeladores

Assim como em machos de outras espécies, no cão também existem indivíduos que são considerados bons ou maus congeladores, ou seja, cães cujo sêmen não se adapta facilmente as biotecnologias tanto da refrigeração como da congelamento. Os diluidores comerciais e feitos em laboratório de pesquisa existentes no mercado atendem bem a demanda para congelar o sêmen da maioria dos cães, porém em certos casos, para o sêmen dos denominados maus congeladores, necessitam um ajuste praticamente individual para se obter sucesso na congelamento. Deve-se ter a atenção focada em como lidar com cães cujo sêmen não congela bem, e em desenvolver diluidores para congelamento individuais para sêmen desses machos (Farstad, 2009). Este fato vem corroborar como a adição de substâncias para melhorar a qualidade do sêmen, seja na nutrição do cão, no diluidor que será utilizado na congelamento, bem como nas amostras descongeladas. A congelabilidade de um espermatozoide canino é determinada pela complexa interação da membrana espermática e o plasma seminal, diluente e protocolos de resfriamento-congelamento-descongelamento. A composição da membrana celular do espermatozoide é por bicamada composta principalmente por fosfolípidios, como colesterol e ácidos graxos saturados, além de ácidos graxos polinsaturados. A integridade da membrana é o pré-requisito fundamental para a função celular normal pós-descongelamento (Schäfer-Somi et al., 2022). A viabilidade espermática refere-se à proporção de espermatozoides vivos e intactos na membrana em uma amostra de sêmen, que é frequentemente usada como um indicador da qualidade do esperma (Schäfer-Somi et al., 2022). Recentemente, a adição de 0,83 mg/ml de colesterol ligado a ciclodextrina (CLC) no sêmen descongelado aumentou a motilidade progressiva e velocidade dos espermatozoides (Ligocka et al., 2024). Existem diferenças no perfil proteico do sêmen de diferentes raças caninas, o que pode melhorar as biotecnologias da reprodução nesta espécie (Araujo e colaboradores 2022). A alteração da qualidade da membrana espermática do esperma e/ou do mecanismo de defesa antioxidante através da suplementação dietética continua sendo uma opção interessante; no entanto, mais experimentos controlados são necessários para fornecer protocolos alimentares eficazes e combinações ideais de suplementos (Aurich, 2008). Derivados de gema de ovo, antioxidantes e, mais recentemente, células tronco mesenquimais são utilizadas com objetivo de melhorar a congelabilidade do sêmen canino (Mahiddine e Kim, 2021).

Marcadores moleculares para prever a congelabilidade do sêmen de cães

Cada ponto crítico das tecnologias de refrigeração e congelamento do sêmen de cães, como protocolos, e composição do diluidor de cães melhoraram com o passar dos anos. O estudo de marcadores de integridade estrutural, do estresse oxidativo, de marcadores genéticos e epigenéticos, do proteoma do espermatozoide e plasma seminal e perfil lipídico (Araujo et al., 2022; Schäfer-Somi et al., 2022; Ďuračka et al., 2023).

Sêmen refrigerado e congelado/descongelado associado a técnica correta da inseminação

O sucesso da inseminação artificial em cães requer diagnóstico do momento ideal da inseminação, coleta e manuseio do sêmen com habilidade e domínio das técnicas de inseminação. A dose de inseminação deve conter pelo menos 150 a 200 × 10⁶ espermatozoides. Espera-se que as taxas de gestação sejam maximizadas usando apenas sêmen com mais de 60% de espermatozoides normais e 70% de motilidade progressiva (sêmen fresco) e 40% de motilidade progressiva (sêmen congelado) (Mason, 2018). O sêmen fresco pode ser inseminado via vaginal, enquanto o sêmen congelado/descongelado deve ser inseminado no interior do útero. São relatadas taxas de prenhez de 84% com sêmen fresco e 69% com sêmen congelado (Linde-Forsberg, 1991; Mason, 2018).

Considerações

Os diluidores e métodos de conservação dos espermatozoides de cães mantidos em temperaturas baixas, seja na refrigeração (5°C) ou na congelamento (-196 °C), estão em constante pesquisa e inovação. Mesmo existindo formulações de diluidores nos quais o sêmen se comporta de maneira excelente, tem que se pensar no ajuste destas mesmas formulações para sêmen de cães considerados mau congeladores.

Existem já descritas técnicas de marcadores moleculares cujo estudo pode incrementar as biotecnologias da reprodução nestas espécies (Araujo et al. 2022; Mahiddine e Kim, 2021).

Referências

- Araujo MS, Paulo, LOH, Scott C, Paranzini, CS, Codognoto, Dell'Aqua, CPF, Papa, FO, Souza, FF.** Insights into the influence of canine breed on proteomics of the spermatozoa and seminal plasma. *Journal of Proteomics*. 2022 Apr 1;257:104508–8.
- Aurich C.** Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science*. 2008 Sep;107(3-4):268–75.
- Bencharif D, Dordas-Perpinya M.** Canine semen cryoconservation: Emerging data over the last 20 years. *Reproduction in Domestic Animals*. 2020 Feb 24;
- Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, et al.** Freezing Canine Sperm: Comparison of Semen Extenders Containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim. Reprod. Sci.* 2010, 119, 305–313.
- Botuflex® 2024.** <https://botupharma.com/produto/botuflex/> Acesso em 14 de abril das 2024 às 14:40h.
- Brito MM, Lúcio CF, Daniel Losano DA, Andressa Dalmazzo, Marcílio Nichi, et al.** Comparison of Cryopreservation Protocols (Single and Two-steps) and Thawing (Fast and Slow) for Canine Sperm. *Animal biotechnology*. 2016 Aug 10;28(1):67–73.
- Cavalcanti TP, Pereira AG, Bezerra LGP, Moreira SSJ, Silva AM, Matos YG, Jorge-Neto PN, Silva AR.** Short-term preservation of canine sperm-binding ability and other metrics using INRA-96 in comparison to Tris-egg yolk extender. *Reproduction in domestic animals*. 2023.6:58(9)
- Christensen BW, Meyers S.** Canine Semen Evaluation and Processing. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2023 Sep 1;53(5):921–30.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- Colombo M, Maria Giorgia Morselli, Gian Gabriele Franchi, Schäfer-Somi S, G.C. Luvoni.** Freezability of Dog Semen after Collection in Field Conditions and Cooled Transport. *Animals*. 2022 Mar 23;12(7):816–6.
- Đuračka M, Benko F, Tvrdá E.** Molecular Markers: A New Paradigm in the Prediction of Sperm Freezability. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2023 Feb 8 24(4):3379. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9960060/>
- Farstad W.** Cryopreservation of Canine Semen - New Challenges. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009 Jul; 44:336–41.
- Flelden ED** Artificial insemination in the dog *N Z Vet J*, 19: 178-184, 1971.
- Foot R.H.** Extenders for freezing dog semen. *American Journal of Veterinary Research*, v.25, n.104, p.37-40, 1964.
- Goericke-Pesch S, Klaus, D, Failing, K., Axel Wehrend, A.** Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Animal Reproduction Science* 135 (2012) 97– 105.
- Hassan Hiba Ali Hassan, Banchi P, Domain G, Rosemary El Khoury, Chaaya R, Eline Wydooghe, et al.** A comparative study of canine epididymal sperm collection techniques and cryopreservation. *Frontiers in veterinary science*. 2023 Oct 24;10.
- Harrop AE.** Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Br Vet J* 1954; 110:424–5.
- Hollinshead FK, Hanlon DW.** Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. *Theriogenology*. 2017 Oct; 101:62–72.
- Hungerford A, Bakos HW, Aitken RJ.** Sperm cryopreservation: current status and future developments. *Reproduction, Fertility and Development* [Internet]. 2022
- Kuczarski AH, Alves de Barros M, Souza de Lima LF, Motheo TF, Bento HJ, Iglesias GA, et al.** Urethral catheterization after pharmacological induction for semen collection in dog. *Theriogenology* [Internet]. 2020
- Ligocka Z, Partyka A, Bonarska-Kujawa D, Mucha A, Nizański W.** Addition of low concentration of cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) has a positive effect on cryopreserved canine spermatozoa evaluated by andrological and biophysical methods. *BMC veterinary research*. 2024 Jan 3;20(1).
- Lima JS, Guaitolini CR de F, Crespilho AM, Dell'Aqua C de PF, Martins MIM, Rigoto RP, et al.** Efeito de meios diluidores na congelabilidade do semen canino. *Brazilian Journal of Development*. 2019;5(9):15841–55.
- Linde-Forsberg C.** Achieving Canine Pregnancy by Using Frozen or Chilled Extended Semen. *Veterinary*

- Clinics of North America: Small Animal Practice. 1991 May;21(3):467–85.
- Linde-Forsberg C.** Artificial insemination with fresh chilled extended and frozen thawed semen in the dog. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1995; 10:48–58
- Lopes STP, Filho M, Hallisson J, Filipe Nunes Barros, Marlon, Soares L, et al.** Eficiência de duas técnicas de recuperação de espermatozoides epididimários de cães e avaliação seminal pós-criopreservação. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*. 2020 Sep 1;72(5):1758–66.
- Mahiddine FY, Kim MJ.** Overview on the Antioxidants, Egg Yolk Alternatives, and Mesenchymal Stem Cells and Derivatives Used in Canine Sperm Cryopreservation. *Animals*. 2021 Jun 28;11(7):1930.
- Mason SJ.** Current Review of Artificial Insemination in Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2018 Jul;48(4):567–80.
- Mason SJ.** An Update on Male Canine Infertility. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice/Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2023 Sep 1;53(5):1063–81.
- Moura CS, Nunes S, Silva BS, Peixoto CA, Silva AR, Silva SV, et al.** Efeito da temperatura de descongelamento na integridade de espermatozoides criopreservados de cães. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*. 2013 Aug 1;65(4):1057–64.
- Nöthling JO, Shuttleworth R.** The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology*. 2005 Mar;63(5):1469–80.
- Payan-Carreira R, Sônia M, Nizański W.** Artificial Insemination in Dogs. Chapter 4, In: *Artificial Insemination in Farm Animals*. <http://www.intechopen.com>. Jun, 21, 2011
- Peña FJ, Nuñez-Martinez, I, Morán JM.** Semen Technologies in Dog Breeding: an Update. *Reproduction in Domestic Animals*. v.41 (Suppl.2), pp.21–29, 2006.
- Randall J.** *Clinical Theriogenology • Volume 12 Number 3 • September 2020*.
- Rodenas C, Parilla I, Roca J, Martinez EA, Lucas X.** Quality of chilled and cold-stored (5 °C) canine spermatozoa submitted to different rapid cooling rates. *Theriogenology*. 2014 Sep 1;82(4):621–6.
- Rowson LEA.** (1954). Infertility of cow, sow and bitch. *Irish Veterinary Journal*, 8, 216–221.
- Santos (Crusco) SEC dos Vannucchi CI, Satzinger S, Assumpção MEOD, Visintin JA.** Comparison of five extenders for canine semen freezing. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science [Internet]*. 1999.
- Schäfer-Somi S, Binder C, Burak J, Papadopoulos N, Ilas J, Boersma A, et al.** Using egg yolk in a TRIS-Equex STM paste extender for freezing of dog semen is superior to egg yolk plasma, also after addition of lecithin and catalase. *Cryobiology*. 2021 Apr;
- Schäfer-Somi S, Colombo M, Gaia Cecilia Luvoni.** Canine Spermatozoa—Predictability of Cryotolerance. *Animals*. 2022 Mar 15;12(6):733–3.
- Sugai N, Werre S, Cecere JT, Balogh O.** Comparing different sperm concentrations for optimizing cooled semen use in the dog. *Frontiers in veterinary science*. 2024 Jan 29;10.
- Thomassen, R, Farstad W, Krogenaes A, Fougner JA, Berg KA.** Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl* 2001;57:341–6.
- Wanasek D, Aurich J, Schäfer-Somi S, Herbel J, Aurich C.** Combined cryopreservation of canine ejaculates collected at a one-hour interval increases semen doses for artificial insemination without negative effects on post-thaw sperm characteristics. *Reproduction in Domestic Animals*. 2021 Jun 26.