



## Utilização de cones de polietileno para coleta de sêmen canino

*The use of polyethylene cones for canine semen collection*

G.R. Valle<sup>1,3</sup>; C.R.G. Andrade<sup>1</sup>; L.C. Silva<sup>1</sup>; L.R. Vianna<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária da PUC Minas, Betim, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Canil da Polícia Militar do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Correspondência: [guilhermerv@pucminas.br](mailto:guilhermerv@pucminas.br)

### Resumo

A utilização de um cone de polietileno produzido com luva de palpação retal para grandes animais (SuperFlex®, WalMur, Argentina) acoplado a tubo de centrífuga para coleta de sêmen foi avaliada em 230 cães de 48 diferentes raças. Houve 94,5% de êxito nas coletas sem traumatismo peniano ou perda de sêmen. Para testar a qualidade do sêmen obtido, ejaculados de 10 cães Pastores Alemães foram submetidos a três tratamentos: 1) controle (C); 2) efusão da amostra pela superfície de um fragmento de polietileno (PP); e 3) manutenção de um fragmento de polietileno mergulhado na amostra (CP). Após 10 min de incubação a 37°C, foram mensuradas a motilidade progressiva (M) e o vigor espermático (V) das amostras. Houve redução significativa de M e V após incubação nos três grupos em relação à amostra inicial, mas M e V foram semelhantes entre os grupos após incubação. O contato do sêmen com o polietileno por curto período (PP) ou por 10 min (CP) não causou efeito deletério sobre a qualidade seminal. Conclui-se ser viável a utilização desse método de coleta de sêmen canino.

**Palavras-chave:** análise seminal, cão, coleta seminal, polietileno.

### Abstract

*The use of a polyethylene cone manufactured with large animal rectal examination glove (SuperFlex®, WalMur, Argentina) attached to a centrifuge tube for collection of semen was evaluated in 230 dogs from 48 different breeds. There was a 94.5% success on collection without penile trauma or semen loss. In order to test the quality of semen collected, ejaculates from 10 German Shepherd dogs were subjected to three treatments: 1) control (C); 2) the sample was flowed through the surface of a polyethylene fragment (PP) and 3) one fragment of polyethylene was kept immersed in the sample (CP). After 10 min of incubation at 37°C, progressive motility (M) and sperm vigor (V) were measured. There was a significant reduction in M and V on the three groups in relation to the initial sample, but M and V were similar among groups after incubation. The contact of semen with polyethylene for a short period (PP) or for 10 min (CP) did not cause deleterious effects on semen quality. It is concluded that is viable to use semen of dogs collected with the proposed method.*

**Keywords:** dog, polyethylene, semen analyzes, semen collection.

### Introdução

O sêmen de cães pode ser coletado com diferentes propósitos: como parte de um exame andrológico; para inseminação artificial; para preservação seminal (Johnston et al., 2001; Kutzler, 2005). O método mais utilizado é a manipulação peniana, mas métodos alternativos, como a eletroejaculação e a indução farmacológica da ejaculação, são descritos (Kutzler, 2005).

O sêmen canino possui três frações, sendo a primeira e a terceira compostas principalmente por secreções da próstata, e a segunda pela fração espermática, originada das caudas dos epidídimos (Johnston et al., 2001).

O equipamento tradicionalmente utilizado para coleta por manipulação peniana é um tubo de ensaio conectado a um funil plástico (Johnston et al., 2001), podendo haver perda parcial da segunda fração e lesões traumáticas penianas durante a coleta decorrentes dos movimentos pélvicos apresentados pelos animais (Johnston et al., 2001). No lugar dos funis plásticos, cones de látex ou polipropileno acoplados a tubos de ensaio permitem envolver o pênis do cão durante a coleta e evitar tais ocorrências (Johnston et al., 2001; Kutzler, 2005). No entanto, alguns desses materiais podem causar danos aos espermatozoides de diversas espécies (Ko et al., 1989; Althouse et al., 1991). O vidro é considerado material ideal para manuseio do sêmen (Check et al., 1988).

Na busca de métodos alternativos para coleta de sêmen, alguns autores sugerem testar materiais plásticos para manipulação seminal (Ziegler et al., 1987; Flick e Merilan, 1988). Foi demonstrado que o látex reduz a motilidade espermática em suínos (Ko et al., 1989) e em cães (Althouse et al., 1991), mas o cloreto de polivinil (PVC) não parece provocar danos aos espermatozoides caninos (Althouse et al., 1991). O polietileno foi indicado como material de escolha para confecção de vaginas artificiais para bovinos (Flick e Merilan, 1988),

uma vez que os cones de polietileno são pouco tóxicos aos espermatozoides, constituindo-se material adequado para coleta nessa espécie (Davis et al., 1993).

O polietileno é um polímero plástico considerado não tóxico e amplamente utilizado em equipamentos de uso biológico (Knasiak-Paluch, 1980; Coutinho et al., 2003), o qual apresenta, dentre outras propriedades, alta maleabilidade, o que lhe confere resistência e maciez (Coutinho et al., 2003).

Este artigo tem o objetivo de descrever e avaliar um método simples de confecção e utilização de cones de polietileno para a coleta de sêmen canino com eficiência e segurança.

## Material e Métodos

### *Avaliação da técnica de coleta de sêmen*

#### *Animais utilizados e condições de coleta*

Foram realizadas coletas de sêmen por um mesmo profissional em 230 cães de 48 diferentes raças, todos cães pós-púberes com idades diversas. As coletas de sêmen faziam parte de avaliações andrológicas para diagnóstico de afecções reprodutivas; realização de inseminação artificial a fresco ou com sêmen refrigerado/transportado; criopreservação; atividades acadêmicas ou experimentação científica. Foram realizadas com ou sem a presença de uma cadela em cio para estimulação sexual dos cães e ocorreram em ambientes diversos, como sobre mesas de exame clínico ou no piso de consultórios veterinários, bem como em áreas abertas ou cobertas com piso pavimentado ou não de canis.

Durante as coletas de sêmen foram avaliadas: 1) a eficácia em se obter sêmen, caracterizada pela obtenção de qualquer volume da segunda fração seminal, acompanhada ou não de outras frações, ou grande volume de fluido seminal em casos de azoospermia; 2) a manifestação de desconforto ao se manipular o pênis, caracterizada por vocalizações, direcionamento do olhar do cão para o pênis ou perda brusca de ereção durante a coleta; 3) a ocorrência de traumatismo peniano durante a coleta, caracterizado por hemorragia da superfície peniana; e 4) a adequada exposição do pênis ereto fora da bainha prepucial.

#### *Confecção do equipamento e técnica de coleta*

Foram confeccionados cones de polietileno utilizando-se luvas de palpação retal para grandes animais (luvas EVA de cinco dedos e 80 cm; Guantes SuperFlex, código 904, WalMur, Argentina). Foi feito um corte na extremidade da luva correspondente ao dedo médio, a qual, com o uso de uma seladora doméstica (Seladora Lorenzetti, Lorenzetti S.A., Brasil), era selada obliquamente, formando um cone. Em seguida, a luva era cortada transversalmente ao nível do antebraço. Na extremidade do dedo médio, acoplava-se um tubo cônico de 15 mL utilizando-se fita adesiva (Fig. 1a). Quando se pretendia fazer coleta fracionada, o mesmo procedimento era adotado, entretanto deixando três dedos da luva (indicador, médio e anular), acoplando-se um tubo a cada dedo.

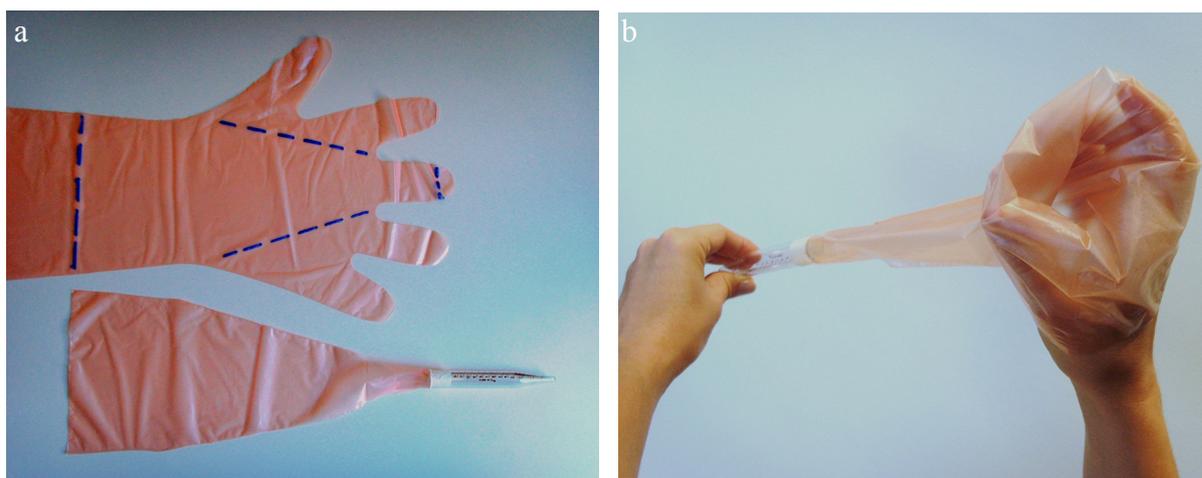


Figura 1. Equipamento de coleta de sêmen: linhas de corte da luva de toque retal e luva cortada e acoplada a um tubo cônico de coleta usando-se fita adesiva (a); cone de polietileno posicionado na mão direita do profissional (b).

Com o profissional posicionado do lado esquerdo do cão, iniciava-se a estimulação peniana do animal com a mão esquerda e, assim que se iniciava a ereção e exposição do pênis, este era revestido pelo cone de polietileno com a mão direita (Fig. 1b e 2a), dando continuidade ao processo. Dessa forma, toda a glândula peniana era mantida dentro do cone plástico e era segurada firmemente com a mão sobre o bulbo peniano, enquanto o cão realizava seus movimentos pélvicos e ejaculação, com o sêmen fluindo para o tubo que era segurado todo o tempo pela mão esquerda do profissional (Fig. 2b, 2c, 2d). Em caso de coleta fracionada, o

mesmo procedimento era adotado, entretanto segurando-se os três tubos com os dedos da mão esquerda. À medida que se identificavam visualmente as mudanças de fração seminal, o fluxo delas era direcionado para o tubo desejado ao mesmo tempo em que os demais eram ocluídos por meio de rotação do tubo sobre seu eixo axial, o que provocava fechamento do tubo plástico formado pelo respectivo dedo da luva.

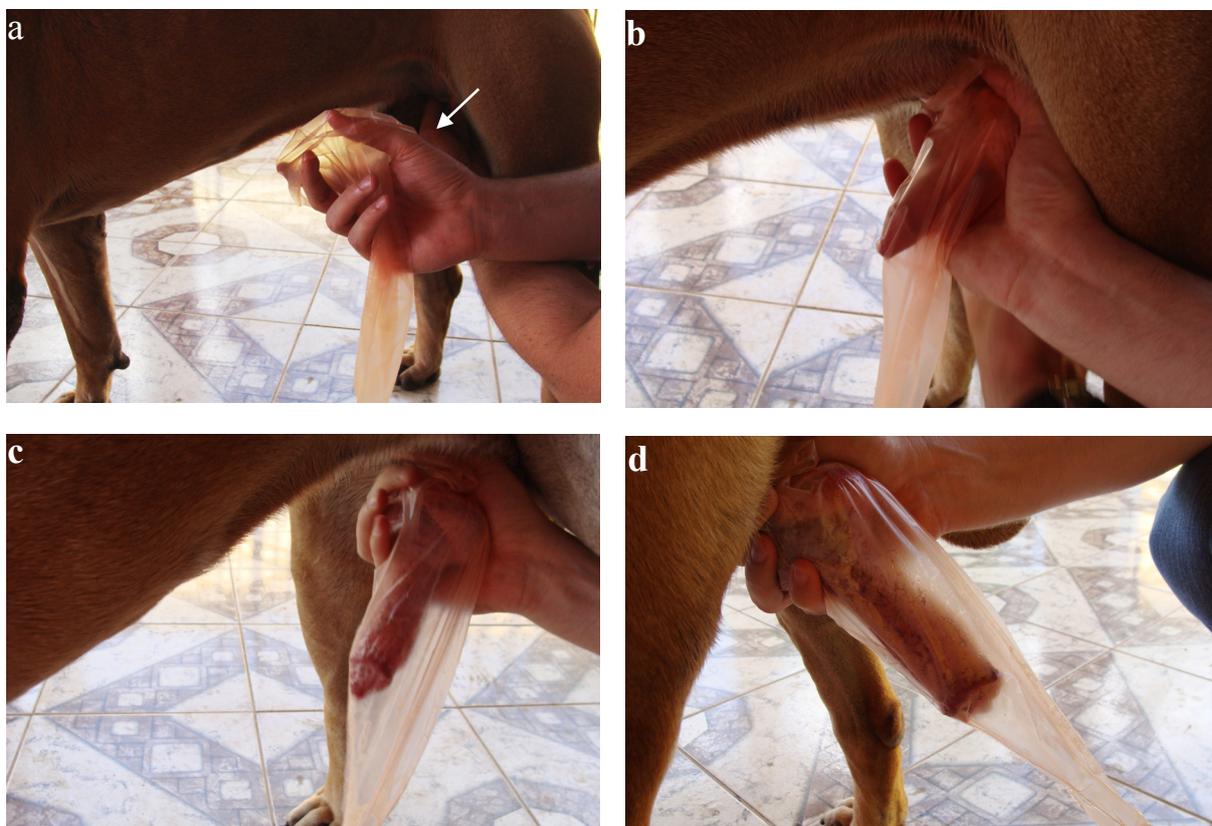


Figura 2. Coleta de sêmen de cão utilizando-se o cone de polietileno: estimulação inicial do pênis com a mão esquerda (seta) enquanto a mão direita está posicionada à frente do óstio prepucial (a); exposição do pênis em ereção inicial e seu envolvimento com o cone de polietileno posicionado na mão direita (b); continuação da estimulação peniana com o pênis já envolvido pelo cone de polietileno (c); após o giro, pênis em ereção completa posicionado caudalmente e ejaculação em andamento (d).

#### *Avaliação do sêmen submetido ao contato com polietileno*

##### *Animais, coleta e avaliação inicial do sêmen*

Para avaliação dos efeitos do método de coleta sobre a qualidade do sêmen obtido, foram coletados 10 ejaculados, um de cada cão da raça Pastor Alemão, previamente selecionados por meio de exame andrológico e considerados normospermicos (Manual..., 1998; Johnston et al., 2001).

Cada coleta foi realizada por meio de manipulação peniana, conforme técnica de rotina (Johnston et al., 2001), e o sêmen foi recolhido em tubo de vidro graduado acoplado a funil também de vidro pré-aquecidos a 37°C. Um volume fixo de sêmen coletado foi estipulado para todos os animais, composto por primeira e segunda frações acrescidas de terceira fração em volume suficiente para que se atingissem 6,0 mL no total. O tubo com sêmen era mantido em banho-maria a 37°C durante todos os procedimentos seguintes. Inicialmente, o sêmen era homogeneizado lentamente por meio de 10 sucções consecutivas com pipeta Pasteur acoplada à pera de sucção; imediatamente depois, eram obtidas amostras para avaliação subjetiva da motilidade progressiva (%) e do vigor (escala de 1 a 5) espermáticos (Manual..., 1998).

As avaliações foram realizadas por dois avaliadores independentemente (sistema duplo-cego), utilizando-se microscopia óptica de luz com aumento de 400x em microscópio com platina aquecida a 37°C. Uma lâmina era confeccionada por um terceiro pesquisador colocando-se uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C em placa aquecedora e depois era submetida aos outros dois avaliadores. O resultado de cada um era anotado pelo terceiro pesquisador, sem que um conhecesse o resultado do outro, e a média dos dois era posteriormente calculada. Quando a diferença entre avaliadores era maior que 10% para motilidade progressiva, ou maior que 1 para vigor espermático, nova lâmina era imediatamente confeccionada e o procedimento repetido, desprezando-se as avaliações anteriores.



### Grupos experimentais e avaliações realizadas

Após a avaliação inicial, o ejaculado era dividido em três alíquotas de 2,0 mL acondicionadas em tubos de vidro mantidos em banho-maria a 37°C, sendo cada alíquota submetida a um tratamento. A primeira, grupo-controle (C), não era submetida a qualquer intervenção; a segunda era vertida pela superfície de um tubo de polietileno com 5,0 cm de comprimento, constituído pelo dedo de uma luva de palpação retal para grandes animais (Guantes SuperFlex, WalMur, Argentina) até chegar ao fundo do tubo de ensaio (PP); e a terceira era exposta a um fragmento de 2,0 cm<sup>2</sup> (1,0 x 2,0 cm) da mesma luva, imerso na amostra de sêmen (CP).

Após um período de incubação de 10 min, o mesmo protocolo inicial de avaliação da motilidade progressiva e vigor espermáticos foi adotado. Entretanto, o terceiro pesquisador promovia uma sequência fixa de avaliação, desconhecida pelos dois outros avaliadores. A primeira avaliação era de CP, seguida de PP e finalmente C, repetida para todos os ejaculados.

### Análise estatística

Inicialmente foram comparadas par a par as características do sêmen total coletado com as amostras de cada grupo experimental após o período de incubação. Para motilidade progressiva foi feita transformação angular ( $\arcsen\sqrt{x}$ ) dos dados e, posteriormente, utilizado o teste t de Student. Para vigor espermático utilizou-se o teste de Wilcoxon.

Em seguida, foram realizadas comparações entre os grupos experimentais. Para motilidade progressiva foi também feita transformação angular ( $\arcsen\sqrt{x}$ ) dos dados e, posteriormente, realizada análise de variância e teste de Student-Newman-Keuls. Para vigor espermático foi utilizado o teste de Friedman.

Em todos os testes foi considerado o nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

### Avaliação da técnica de coleta de sêmen

Dos 230 cães utilizados, em 217 (Tab. 1) houve êxito na coleta numa primeira ou segunda tentativa, revelando eficácia de 94,3% em se obter sêmen. Quando não se conseguia coletar numa primeira tentativa, na segunda utilizava-se o mesmo método, porém sob diferentes condições ambientes e/ou de estimulação sexual por uma cadela em cio. Foram consideradas como falhas de coleta situações em que, mesmo após esses procedimentos, o sêmen não tenha sido obtido.

Não foram encontrados relatos na literatura consultada da incidência de falhas na obtenção de sêmen em cães utilizando-se o método de manipulação peniana. Entretanto, a falha pode ocorrer, independentemente do método de coleta utilizado, em cães sob estresse, debilitados ou inexperientes, ou em caso de falta de estímulo sexual adequado, decorrendo falha total ou parcial da ejaculação, principalmente faltando a fração espermática (Johnston et al., 2001; Kutzler, 2005). Portanto, as falhas aqui observadas não parecem ser em razão do método de coleta empregado.

Tabela 1. Número de cães em que foram realizadas as coletas de sêmen com o cone de polietileno, discriminados por raças.

Raça	n°	Raça	n°	Raça	n°
Afghan Hound	01	Dálmata	01	Pequinês	01
Akita	02	Doberman	03	Poodle	13
American Akita	01	Doberman Pinscher	03	Portuguese Water Dog	01
Am. Cocker Spaniel	06	Dogue Alemão	11	Pug	10
Am. Pit Bull Terrier	01	Dogue de Bordeaux	04	Rottweiler	11
Am. Staffordshire Terrier	03	Fila Brasileiro	07	São Bernardo	06
Basset Hound	07	Fox Terrier	02	Schnauzer	09
Beagle	03	Golden Retriever	02	Scottish Terrier	03
Bichon Frise	06	Husky Siberiano	03	sem raça definida	18
Boxer	03	Italian Greyhound	01	Sheepdog	01
Bulldogue Francês	03	Kerry Blue Terrier	01	Shar-Pei	02
Bulldogue Inglês	09	Labrador	03	Shih-Tzu	03
Bull Mastif	02	Lhasa Apso	03	Weimaraner	01
Bull Terrier	02	Maltês	03	Whippet	01
Collie	02	Pastor Alemão	19	Wire Fox Terrier	02
Dachshund	07	Pastor de Shetland	03	Yorkshire Terrier	08
Total					217

A grande variedade de raças e portes físicos dos cães trabalhados denota que o método utilizado se adequou a diferentes portes físicos e tamanhos de pênis. As falhas em se obter sêmen ocorreram em animais de



raças e portes físicos diversos.

Quando em algumas situações foram confeccionados cones menores para cães de menor porte físico, percebeu-se que o tamanho do cone plástico deveria ser o mesmo, independentemente do porte físico do cão, pois deve se adaptar ao tamanho da mão do profissional (Fig. 1b), e não ao tamanho do pênis. Em cães de pequeno porte, cones menores dificultaram a coleta. Nesse contexto, uma manobra útil durante a coleta em cães de porte pequeno é a de, após obtida a ereção do bulbo da glândula e o cone plástico estar posicionado ao redor do pênis, com o auxílio da outra mão, fazer tração do cone plástico até que a ponta do pênis se aproxime do tubo de coleta.

Em nenhuma das coletas realizadas houve perda, mesmo que parcial, de sêmen, fato que pode ocorrer quando se utiliza o método de coleta com funil plástico. Alguns cães, ao realizarem vigorosos movimentos pélvicos durante a coleta, tornam difícil recolher todos os jatos de sêmen sem que haja perdas (Kutzler, 2005).

Dos 13 casos em que houve falha na obtenção de sêmen, em alguns deles a excessiva manipulação na tentativa de se obter ejaculação resultou em desconforto manifestado por vocalizações discretas e/ou olhar em direção ao pênis. Em um cão, submetido previamente à orquiectomia unilateral, durante a coleta houve manifestação de dor revelada por perda brusca de ereção ao se tentar realizar o giro peniano, mas sem prejuízo para a coleta da segunda fração do sêmen, não sendo obtida a terceira fração.

Em diversas oportunidades, aqui não quantificadas, uma pequena hemorragia de vasos da superfície peniana foi observada, sem que estivesse relacionada ao êxito na coleta ou à manifestação de desconforto pelo cão. Não há relatos na literatura consultada dessa ocorrência, mas, mesmo com o método tradicional de coleta (Johnston et al., 2001), eventualmente esse fato ocorre, sem que sequer haja contaminação do sêmen com sangue e maiores consequências para o cão (Valle GR, 2012; PUC Minas; dados não publicados). Tais situações não foram aqui consideradas como traumatismo peniano.

O uso de lubrificantes no momento da coleta poderia minimizar tal ocorrência, mas não parece ser este o fator determinante para que se tenha obtido êxito na coleta, além de ser seu uso potencialmente deletério à qualidade do sêmen (Froman e Amann, 1983).

O traumatismo peniano durante a coleta pode ocorrer em cães que executam movimentos pélvicos muito vigorosos, levando à colisão peniana contra a borda do funil de coleta na tentativa de não se perderem jatos de sêmen, o que causa hemorragia, dor e conseqüente perda da ereção e falha na ejaculação (Johnston et al., 2001). Ao envolver o pênis com o cone de polietileno, mantendo-o preso com a mão, mesmo quando os cães apresentavam movimentos pélvicos vigorosos ou até mesmo montavam as cadelas utilizadas para estimulá-los sexualmente, não ocorreu qualquer perda de sêmen ou traumatismo peniano.

Em 10 cães ocorreu ereção do pênis ainda dentro do prepúcio, fato que eventualmente acontece durante a coleta em cães (Johnston et al., 2001). Não se pode atribuir esse fato ao método de coleta utilizado, uma vez que a falha em expor o pênis antes da ereção do bulbo da glândula ocorre durante o início da estimulação peniana, processo comum ao método de coleta tradicional e com o cone de polietileno. Entretanto, quando isso ocorreu, foi mais difícil a fixação do cone plástico por não ter havido a exposição adequada do pênis. Envolver em conjunto o pênis e a bainha prepucial tornou a coleta, ainda que possível, mais trabalhosa do que pelo método tradicional.

Diante dos resultados aqui obtidos, a flexibilidade e a textura macia das luvas de polietileno propiciam fácil fixação em torno do pênis do cão, aparentemente sem lhe causar desconforto, permitindo uma coleta de sêmen segura para o cão e sem perdas de sêmen. Cones para coleta de sêmen canino confeccionados de látex e polipropileno são descritos na literatura (Johnston et al., 2001; Kutzler, 2005), porém com potencial toxicidade para o sêmen (Ko et al., 1989; Althouse et al., 1991). Já o polietileno é relatado como seguro para uso na coleta de sêmen de bovinos (Davis et al., 1993), mas não testado para o sêmen de cães.

#### *Avaliação do sêmen submetido ao contato com polietileno*

A Tab. 2 mostra as características dos ejaculados antes e após o período de incubação em cada grupo experimental, revelando que a motilidade progressiva e o vigor espermáticos foram igualmente afetados pelo período de incubação de 10 minutos a 37°C ( $P < 0,05$ ), independentemente do tratamento recebido.

Tabela 2. Características seminais iniciais e finais dos ejaculados de acordo com os grupos experimentais.

Característica seminal	Amostra inicial	Amostra final		
		C	PP	CP
Motilidade progressiva (%)	79,8 +/- 7,9 <sup>a</sup>	62,3 +/- 11,3 <sup>b</sup>	69,0 +/- 9,9 <sup>b</sup>	64,4 +/- 5,3 <sup>b</sup>
Vigor (1-5)	3,4 +/- 0,6 <sup>a</sup>	2,3 +/- 0,6 <sup>b</sup>	2,4 +/- 0,5 <sup>b</sup>	2,3 +/- 0,5 <sup>b</sup>

C (controle); PP (sêmen passou pelo polietileno); CP (polietileno imerso na amostra de sêmen).

<sup>a,b</sup>indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre valores inicial e final na mesma linha.

Esta queda da motilidade progressiva e do vigor, comum aos três grupos experimentais em relação à amostra inicial, pode ter ocorrido em razão do esgotamento das reservas de energia disponíveis aos espermatozoides, acúmulo de catabólitos no meio e exposição prolongada ao fluido seminal (Vale Filho et al.,



2011). Em cães, a presença da fração prostática é considerada deletéria à manutenção da viabilidade espermática *in vitro* (England e Allen, 1992). Entretanto, para que fosse possível a realização deste experimento, foi necessária a inclusão da fração prostática na amostra inicial, possibilitando o volume necessário para dividi-la em três alíquotas destinadas aos grupos experimentais. Se coletada apenas a fração espermática do sêmen, tal fato poderia não ter ocorrido.

Após o período de incubação, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na motilidade progressiva e no vigor espermáticos entre grupos experimentais (Tab. 2), revelando não ter havido efeito da exposição rápida (PP) ou prolongada (CP) ao polietileno sobre o metabolismo espermático. O grupo PP simulou os poucos segundos em que o sêmen tem contato com o polietileno durante a coleta de sêmen com o cone plástico descrito; e o grupo CP simulou uma situação de contato mais prolongado do sêmen com o polietileno, fato que normalmente não ocorre durante a coleta pelo método proposto. No entanto, poderia ocorrer se fosse utilizado um tubo de coleta também de polietileno, e não de vidro.

A exposição ao látex (Ziegler et al., 1987; Althouse et al., 1991; Davis et al., 1993), ao silicone (Ziegler et al., 1987) e ao PVC (Ziegler et al., 1987) é deletéria ao sêmen de diferentes espécies, apesar de o PVC ter se mostrado não tóxico para o sêmen canino por até cinco minutos de exposição a 37°C (Althouse et al., 1991). Os resultados aqui obtidos, de forma semelhante ao relatado para o sêmen bovino (Davis et al., 1993), mostraram não afetar a viabilidade espermática do cão em até 10 minutos de exposição ao polietileno, viabilizando a utilização de equipamentos confeccionados com esse material na coleta de sêmen canino.

### Conclusão

Conclui-se que a utilização de cones de polietileno confeccionados com luvas para toque retal de grandes animais é uma boa alternativa para a coleta de sêmen em cães, revelando ser um método seguro por evitar traumas penianos aos cães e perda de espermatozoides durante a coleta, bem como por não apresentar efeito deletério aos espermatozoides.

### Agradecimentos

Esta pesquisa contou com a colaboração do Canil da Polícia Militar do Estado de Minas Gerais, da PUC Minas e da FAPEMIG.

### Referências

- Althouse GC, Ko JCH, Hopkins SM, Evans LE.** Effect of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoal motility. *J Am Vet Med Assoc*, v.199, p.227-229, 1991.
- Check JH, Shanis BS, Wu CH.** Evaluating glass, polystyrene, and polypropylene containers for semen collection and sperm washing. *Arch Androl*, v.20, p.251-255, 1988.
- Coutinho FMB, Mello IL, Maria LCS.** Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. *Polímeros Ciênc Tecnol*, v.13, p.1-13, 2003.
- Davis NS, Rothmann SA, Tan M, Thomas Jr AJ.** Effect of catheter composition on sperm quality. *J Androl*, v.14, p.66-69, 1993.
- England GCW, Allen WE.** Factors affecting the viability of canine spermatozoa II: Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, v.37, p.373-381, 1992.
- Flick DL, Merilan CP.** Toxicity of artificial vagina liners for bovine spermatozoa. *Theriogenology*, v.29, p.1207-1213, 1988.
- Froman DP, Amann RP.** Inhibition of motility of bovine, canine and equine spermatozoa by artificial vagina lubricants. *Theriogenology*, v.20, p.357-361, 1983.
- Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS.** Semen collection, evaluation, and preservation. In: Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p.287-306.
- Knasiak-Paluch D.** Toxicity of plastic materials as evaluated by means of bull semen (preliminary report). *Pol J Pharmacol Phar*, v.32, p.109-114, 1980.
- Ko JCH, Evans LE, Althouse GC.** Toxicity effects of latex gloves on boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.31, p.1159-1164, 1989.
- Kutzler MA.** Semen collection in dog. *Theriogenology*, v.64, p.747-754, 2005.
- Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.
- Vale Filho VR, Valle GR, Nascimento EF.** Patologia espermática. In: Nascimento EF, Santos RL. *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. 3.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.129-149.
- Ziegler D, Cedars MI, Hamilton F, Moreno T, Meldrum DR.** Factors influencing maintenance of sperm motility during *in vitro* processing. *Fertil Steril*, v.48, p.816-820, 1987.