



Criopreservação de sêmen canino em diluente Tris adicionado de dodecil sulfato de sódio

Cryopreservation of canine semen in Tris extender added by sodium dodecyl sulfate

L.L.M. Costa, T.S. Castelo, A.L.P. Souza, G.L. Lima, A.R. Silva¹

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

¹Correspondência: legio2000@yahoo.com

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do dodecil sulfato de sódio (SDS) na criopreservação do sêmen canino. Dez ejaculados foram obtidos de cinco cães machos adultos. O sêmen fresco foi avaliado subjetivamente e criopreservado. Os tratamentos consistiram em um grupo-controle, formado pelo diluente Tris-gema (20%) e pelo glicerol, e os grupos-teste, sendo o mesmo diluente acrescido de 0,1 ou 0,2% de SDS. Após a descongelação, o sêmen foi avaliado subjetivamente e por meio da análise computadorizada (CASA). Observou-se uma redução significativa da qualidade espermática após a descongelação. Entretanto, não houve diferenças entre os tratamentos e o controle ($P > 0,05$) para nenhum dos parâmetros seminais avaliados. Conclui-se que a adição do SDS nas concentrações de 0,1 e 0,2% ao diluente Tris-gema-glicerol não influencia a qualidade do sêmen canino após a descongelação.

Palavras-chave: cão, criopreservação, SDS, sêmen.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on the cryopreservation of canine semen. Ten ejaculates were obtained from five mature dogs were used. The fresh semen was subjectively evaluated and cryopreserved. The treatments consisted in a control group formed by Tris-based extender plus egg yolk (20%) and glycerol (6%); the testing groups were formed by the same extender plus 0.1 or 0.2% SDS. After thawing, semen was evaluated through light microscopy and computer-assisted analysis (CASA). A significant reduction in semen quality was verified after thawing. However, there were no differences between treatments and control for any sperm characteristic ($P > 0.05$). In conclusion the addition of 0.1 or 0.2% SDS to Tris-based extender does not influence the quality of the canine semen after thawing.

Keywords: cryopreservation, dog, SDS, semen.

Introdução

As biotécnicas reprodutivas mais utilizadas na reprodução assistida em cães são a inseminação artificial (Makloski, 2012) e a preservação do sêmen (Madeira et al., 2010). Esta última tem sido realizada de duas maneiras: por meio do resfriamento (Wittayarat et al., 2012), que busca a utilização em curto prazo, e da congelamento (Futino et al., 2010), que mantém o sêmen viável por tempo indeterminado. Entretanto, os resultados de fertilização após a inseminação com sêmen criopreservado são variáveis, fato atribuído principalmente às variações na qualidade do sêmen canino congelado-descongelado (Schafer-Somi e Aurich, 2006).

O processo de conservação de sêmen ocasiona danos espermáticos, como redução da motilidade e do vigor e aumento das alterações morfológicas, entre outros que implicam a redução da qualidade do sêmen preservado (Silva et al., 2009). Diante desse fato, vários estudos têm sido realizados visando aperfeiçoar diversos aspectos na criopreservação do sêmen canino, como variação nos diluentes, tipos de crioprotetores, métodos de criopreservação, além de taxas de resfriamento e descongelação (Futino et al., 2010; Madeira et al., 2010). A fim de solucionar essa problemática, foram identificadas substâncias de vital importância na tecnologia do sêmen designadas de diluentes, entre os quais aquele à base de Tris (Tris-hidroximetil-aminometano - $H_2NC(CH_2OH)_3$), que permanece como o mais utilizado para a criopreservação do sêmen de cães (Silva et al., 2002, 2009).

A incorporação de detergentes derivados do dodecil sulfato de sódio (SDS) aos diluentes, como o Equex STM (Nova Chemical, Scituate, MA, USA; Bencharif et al., 2012) e o Orvus ES (Nova Chemical, Scituate, MA, USA; Tsutsui et al., 2000b), tem sido realizada no intuito de melhorar os resultados de sobrevivência espermática após a descongelação. Segundo Peña e Linde-Forsberg (2000), o SDS é um detergente aniônico do grupo alquil, cujo efeito protetor sobre a célula espermática não está ainda totalmente compreendido. Acredita-se que ele solubilize as lipoproteínas da gema de ovo e aumente seu potencial de proteção à célula espermática. Estes autores alertam para o fato de que uma exposição prolongada dos espermatozoides ao SDS poderia conferir um excesso de fluidez à sua membrana plasmática, ocasionando um prejuízo à qualidade espermática.



Haja vista que as pastas Equex STM e Orvus ES são produtos comerciais com marca registrada, a exata proporção de SDS que entra em sua composição é desconhecida. Assim, como essas pastas não estão disponíveis comercialmente no Brasil, a incorporação direta do SDS aos diluentes poderia ser uma alternativa para conferir melhor qualidade ao sêmen canino após a criopreservação. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição do detergente SDS, em diferentes concentrações, ao diluente Tris na criopreservação do sêmen canino.

Material e Métodos

Animais

Cinco cães machos maduros, oriundos de *canis particulares*, localizados na cidade de Mossoró-RN foram utilizados para o estudo, sendo três da raça American Pit Bull Terrier, um da raça Rottweiler e outro da raça Bull Terrier, com variação de peso entre 20 e 32 kg. A idade dos animais variou de 18 a 60 meses. Previamente, foram realizadas anamnese e avaliação do histórico reprodutivo dos animais e, por ocasião de cada coleta, foi avaliado o estado geral, realizando-se exame físico da genitália externa e espermograma. Todos os animais foram alimentados uma vez ao dia, com ração comercial peletizada, e receberam água *ad libitum* no decorrer do experimento.

Coleta de sêmen e avaliação

Cada cão foi submetido à coleta de dois ejaculados, com intervalo de uma semana, por meio da técnica de manipulação digital do bulbo peniano. Os ejaculados foram coletados em tubos graduados acoplados a um funil, e as frações seminais foram separadas de acordo com a modificação da sua coloração. As frações espermáticas foram avaliadas macroscopicamente quanto ao volume e à cor. Em seguida, procedeu-se à avaliação microscópica (100X) da motilidade e do vigor espermáticos.

A viabilidade espermática foi avaliada por meio de um esfregaço corado em azul de bromofenol na proporção de 1:1 (Derivaux, 1980). Outro esfregaço, corado em rosa de bengala, foi confeccionado visando à avaliação das alterações morfológicas, mediante microscopia de luz (1000X), em que foram contadas 200 células espermáticas e calculou-se a sua proporção. As referidas alterações morfológicas foram classificadas como normais ou com alterações morfológicas primárias ou secundárias. A concentração espermática foi verificada utilizando-se a câmara de Neubauer (Cardoso et al., 2003). O teste hiposmótico (HOST) foi realizado imediatamente após a coleta do sêmen, utilizando-se a água destilada (0 mOsm/L) como solução hiposmótica, a fim de se avaliar a integridade funcional da membrana espermática (Quintela et al., 2010).

Diluentes

O diluente utilizado neste experimento consistia no tampão Tris (Silva et al., 2002), constituído por uma solução contendo: 3,187 g de Tris-hidroximetil-aminometano, 1,781 g de ácido cítrico mono-hidratado e 1,316 g de D-frutose, dissolvidos em 100 mL de água destilada.

Como grupo-controle, foi utilizado apenas o tampão Tris, conforme metodologia previamente descrita para cães por Silva et al. (2002). Como tratamentos, foram testados dois grupos compostos por tampão Tris acrescido de 0,1% (T-SDS 0,1) e 0,2% (T-SDS 0,2) de SDS, conforme metodologia descrita por Aboagla e Terada (2004).

Todos os diluentes foram preparados em um lote único e armazenados em *freezer* a -18°C. Imediatamente antes da coleta, estes eram descongelados e acrescidos de 20% de gema de ovo.

Processamento do sêmen

Imediatamente após coleta e análise inicial, cada amostra de sêmen era dividida em três alíquotas destinadas à diluição com o grupo-controle e com os dois tratamentos. A diluição foi realizada em temperatura ambiente (aproximadamente 27°C). Em seguida, as amostras foram armazenadas em tubos de vidro, e estes colocados em um recipiente com água e acondicionados em caixa térmica com gelo reciclável (15°C) por 40 minutos, quando foram atingidas temperaturas entre 12 e 15°C. Após esse período, o sêmen diluído foi transferido para um refrigerador até atingir 4°C (30 minutos), quando foi realizada a glicerolização a 6% e atingida uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL. Nesse momento, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, as quais foram identificadas, com número da coleta, nome do animal e concentração do diluente utilizado. Estas foram vedadas com álcool polivinílico e depois dispostas horizontalmente em rampa de congelação a uma altura de 5 cm do nível de nitrogênio líquido, por cinco minutos, atingindo temperatura próxima a -70°C. Finalmente, o sêmen foi armazenado em nitrogênio líquido a -196°C (Silva et al., 2002).



Descongelação e análise do sêmen

As amostras foram transportadas para o Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará, em Fortaleza, Ceará, onde se procedeu à descongelação do sêmen, mediante a imersão das palhetas em banho-maria a 38°C por um minuto. Em seguida, realizou-se a avaliação da porcentagem de espermatozoides vivos, da morfologia espermática, da integridade acrossomal e do teste hiposmótico, conforme citado para o sêmen fresco.

As amostras foram ainda avaliadas por meio da análise computadorizada (CASA), segundo as recomendações de Verstegen e Iguer-Ouada (2002). Aliquotas de sêmen (10 µL) foram colocadas em uma câmara de Makler pré-aquecida a 37°C e, em seguida, examinadas em um microscópio de contraste de fase com iluminação estroboscópica acoplado a uma videocâmera adaptada ao Sperm-Class Analyzer (SCA version 3.2.0; Microptic S.L., Barcelona, Spain). Três diferentes e não consecutivos campos foram selecionados aleatoriamente e avaliados. Os dados foram computadorizados e determinados por média e erro-padrão. Os seguintes parâmetros foram medidos para cada amostra: o número de células contadas; a porcentagem da motilidade espermática total; a velocidade média da trajetória (VMT); a velocidade linear progressiva (VLP); a velocidade curvilínea (VCL); a amplitude lateral da cabeça (ALC); a frequência do batimento cruzado (FBC); o índice de progressão (IP); e o índice de linearidade (IL). Em adição, as células foram estratificadas de acordo com a velocidade de progressão em diferentes subpopulações.

Análise estatística

Foram realizadas dez repetições para o grupo-controle e para cada tratamento. Os resultados foram avaliados por um programa para análises estatísticas (SAS 6.10, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e expressos na forma de média e erro-padrão, sendo o delineamento experimental realizado em blocos ao acaso. Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste Cramer-von Mises e, quando necessário, os valores sofreram transformação angular em arco seno. Para avaliação do efeito das diferentes variáveis (animal, ordem de coleta, e tratamentos de diluição) e suas interações, foi utilizado um modelo linear geral. As comparações entre os tratamentos foram realizadas pela análise de variância seguida do teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados

O sêmen fresco dos animais apresentou um volume médio de $1,4 \pm 0,12$ mL, com uma concentração $932,8 \pm 74,6 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Verificou-se uma motilidade espermática subjetiva de $99 \pm 1\%$ com vigor 5 ± 0 . Os resultados referentes à resposta osmótica, à porcentagem de espermatozoides vivos e às alterações morfológicas para o sêmen fresco e descongelado estão expressos na Tab. 1. Uma redução da qualidade espermática após a descongelação em referência a todos estes parâmetros foi observada ($P < 0,05$), no entanto não foram verificadas diferenças entre os grupos experimentais ($P > 0,05$).

Tabela 1. Integridade de membrana, porcentagem de células vivas e com morfologia normal no sêmen canino fresco e descongelado, após diluição em Tris-gema-glicerol (TGG), e deste adicionado de 0,1 (TGG-SDS 0,1) ou 0,2% (TGG-SDS 0,2) de dodecil sulfato de sódio.

	Sêmen fresco	Grupos experimentais		
		TGG	TGG-SDS 0,1	TGG-SDS 0,2
Integridade de membrana (%)	$95,9 \pm 0,6^a$	$74,3 \pm 15,0^b$	$67,9 \pm 15,1^b$	$68,3 \pm 17,4^b$
Viabilidade (%)	$87,9 \pm 2,8^a$	$66,2 \pm 23,3^b$	$77,3 \pm 10,8^b$	$79,9 \pm 15,1^b$
Morfologia normal (%)	$96,0 \pm 1,6^a$	$65,3 \pm 12,3^b$	$69,1 \pm 16,0^b$	$64,7 \pm 14,7^b$

^{a,b}Médias acompanhadas por letras distintas, na mesma linha, diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

Na Tab. 2, estão descritos os resultados referentes às características espermáticas avaliadas pelo sistema CASA após a descongelação. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais para nenhum dos padrões de motilidade avaliados ($P > 0,05$).

Com relação à análise das subpopulações espermáticas no sêmen canino descongelado (Fig. 1), foram observados os valores de $52,2 \pm 28,7\%$, $47,8 \pm 27,2\%$ e $49,9 \pm 13,2\%$ de espermatozoides estáticos; $37,2 \pm 20,5\%$, $39,5 \pm 17,9\%$ e $39,5 \pm 9,7\%$ de espermatozoides com velocidade lenta; $7,5 \pm 7,1\%$, $8,8 \pm 7,8\%$, $7,7 \pm 4,9\%$ com velocidade média; e $3,1 \pm 3,1\%$, $4,0 \pm 4,0\%$ e $3,0 \pm 3,1\%$ com velocidade rápida, para TGG, SDS 0,1 e SDS 0,2, respectivamente. Também para esta avaliação, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos para cada subpopulação ($P > 0,05$), mas denotou-se maior quantidade de espermatozoides lentos e estáticos para todos os grupos ($P < 0,05$).



Tabela 2. Padrões de motilidade espermática no sêmen canino diluído em Tris-gema-glicerol (TGG) e deste adicionado de 0,1 (TGG-SDS 0,1) ou 0,2% (TGG-SDS 0,2) de dodecil sulfato de sódio, mediante análise computadorizada.

Características	Diluyente		
	TGG	TGG-SDS 0,1	TGG-SDS 0,2
Motilidade total (%)	47,8 ± 9,1	52,2 ± 8,0	50,1 ± 4,3
Velocidade média na trajetória (VMT - $\mu\text{m/s}$)	34,4 ± 2,7	35,4 ± 3,5	34,9 ± 2,4
Velocidade curvilinear (VCL - $\mu\text{m/s}$)	51,0 ± 4,0	50,6 ± 4,7	49,1 ± 3,2
Velocidade linear progressiva (VLP - $\mu\text{m/s}$)	24,4 ± 2,1	25,9 ± 2,7	26,0 ± 2,2
Amplitude lateral de cabeça (ALC - μm)	3,6 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,4 ± 0,2
Freq. de batimento cruzado (FBC - Hz)	9,1 ± 0,6	8,9 ± 0,8	9,6 ± 0,7
Índice de linearidade (IL - %)	47,7 ± 2,0	51,2 ± 2,2	52,6 ± 2,0
Índice de progressão (IP - %)	70,5 ± 1,9	73,0 ± 1,5	73,7 ± 2,1

($P > 0,05$).

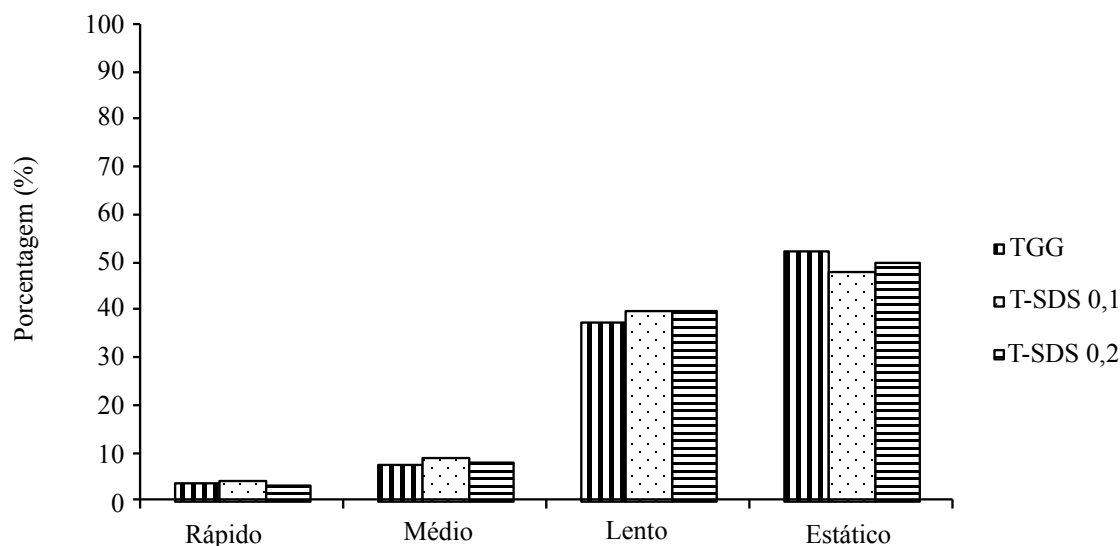


Figura 1. Subpopulações espermáticas estratificadas por velocidade de progressão, determinadas por meio de análise computadorizada no sêmen canino descongelado, utilizando-se o diluente Tris-gema-glicerol (TGG) puro, ou adicionado de dodecil sulfato de sódio (T-SDS) nas concentrações de 0,1 e 0,2%.

Discussão

As características do sêmen fresco utilizado no presente estudo estão dentro da normalidade para cães adultos, em que o volume médio da fração espermática do ejaculado canino varia de 0,5 a 3,5 mL (Gunzel-Apel, 1994); a concentração espermática deve estar acima de 300×10^6 espermatozoides/mL (Root-Kustritz, 2007); e a integridade de membrana espermática deve estar acima de 85% (Pinto e Kozink, 2007).

Após a descongelação, foram observados valores médios de 50% de espermatozoides móveis para todos os tratamentos. Ressalta-se que estes valores encontram-se dentro da faixa considerada aceitável para a realização de inseminações artificiais nesta espécie (Concannon e Battista, 1989). Esses resultados obtidos com o uso do diluente Tris assemelham-se àqueles descritos para a congelação do sêmen em diluente à base de água de coco (Madeira et al., 2010). Porém, são inferiores àqueles obtidos no uso do diluente Tris associado à pasta Equex STM, com a qual foram verificados $68,5 \pm 9,6\%$ móveis após a descongelação (Martins-Bessa et al., 2006). No entanto, existem controvérsias quanto à necessidade de utilização desta pasta, haja vista que já foi reportada a obtenção de $68,7 \pm 9,3\%$ de espermatozoides móveis após a descongelação e 70% de interação destes espermatozoides com oócitos homólogos, sem a necessidade de adicionar pastas derivadas de SDS (Silva et al., 2006).

Alhaider e Watson (2009) observaram maior motilidade espermática para as amostras de sêmen canino criopreservadas com diluentes acrescidos da pasta Equex[®] em comparação àqueles que não a continham. Por outro lado, nesse mesmo experimento, a adição da referida pasta não proporcionou incremento sobre a



viabilidade, a integridade acrossomal e a concentração intracelular de cálcio, o qual está relacionado à viabilidade funcional da célula. Esses resultados estão em consonância com os obtidos no presente trabalho, em que não foi verificado incremento na qualidade espermática quando da adição de SDS.

Com relação ao estudo das características dos movimentos dos espermatozoides pelo sistema CASA, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos. No estudo descrito por Bencharif et al. (2010), o uso da pasta Equex na composição do diluente para criopreservação do sêmen canino proporcionou uma motilidade espermática pós-descongelção de 47,9%, superior aos 27,7% obtidos sem a utilização dela. Entretanto, tais resultados reportados pelos referidos autores, com ou sem SDS, são inferiores aos obtidos no presente estudo. Além disso, tanto no trabalho de Bencharif et al. (2010) como no presente estudo, não foram verificados efeitos positivos relativos à adição de derivados do SDS aos diluentes no tocante à preservação da integridade de membrana plasmática do espermatozoide canino.

Sabe-se que o SDS aumenta a permeabilidade da membrana espermática, reduzindo o choque osmótico (Arriola e Foote, 1987). Acredita-se que este surfactante solubilize e aumente a dispersão dos glóbulos de gema de ovo no diluente, aumentando o contato entre as substâncias protetoras presentes na gema e a membrana plasmática (Tsutsui et al., 2000a). Porém, altas concentrações desta substância no diluente poderiam provocar danos às membranas das células espermáticas (Aboagla e Terada, 2004). Com base nesta hipótese, em caprinos, foi demonstrado que concentrações muito baixas de SDS, em torno de 0,05 a 0,1%, adicionadas a diluentes à base de trealose, promovem uma melhora significativa nos resultados pós-descongelção (Aboagla e Terada, 2004). Nos cães, não foram encontradas citações acerca do uso de baixas concentrações de SDS para a congelção de sêmen, sendo que apenas um experimento prévio havia demonstrado que a adição de 2 mg/mL de SDS promove resultados pós-descongelção semelhantes àqueles obtidos no uso do diluente Tris adicionado de 0,75% da pasta Orvus EP (Hori et al., 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho configura-se como um dos pioneiros a testar a adição de SDS em baixas concentrações na congelção do sêmen de cães. Contudo, os resultados apresentados mostram que a presença do SDS adicionado ao diluente Tris em concentrações de 0,1 e 0,2% não influencia na qualidade do sêmen de cão após a descongelção, sendo sugestiva a realização de estudos com outras concentrações dessa substância. Além disso, é possível que os efeitos benéficos das pastas derivadas de SDS adicionadas aos diluentes para o sêmen canino (Bencharif et al., 2010) possam ter origem não somente da ação do SDS, mas de uma associação deste com outras substâncias desconhecidas presentes nas pastas comerciais. Esta hipótese pode ser suportada pelo recente estudo realizado por Tsutsui et al. (2011), os quais compararam a adição de 3g/mL de SDS puro ou 1% da pasta Orvus EP[®] ao diluente Tris-gema para a congelção do sêmen de felinos e observaram que não existiam diferenças quanto à qualidade de sêmen imediatamente após a descongelção, porém o grupo que utilizou a pasta Orvus EP[®] proporcionou uma melhor taxa de concepção (70 x 30%) que o grupo adicionado de SDS após realização de inseminação artificial intrauterina.

Diante do exposto, conclui-se que a adição do detergente aniônico dodecil sulfato de sódio em baixas concentrações de 0,1 e 0,2% ao diluente à base de Tris adicionado de gema de ovo e glicerol não influencia a qualidade do sêmen canino após a descongelção.

Referências

- Aboagla EME, Terada T.** Effects of supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezeability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.809-818, 2004.
- Alhaider AK, Watson PF.** Cryopreservation of dog semen: the effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. *Anim Reprod Sci*, v.110, p.147-161, 2009.
- Arriola J, Foote RH.** Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J Dairy Sci*, v.70, p.1664-1670, 1987.
- Bencharif D, Amirat-briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz V, Tainturier D.** Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex[®] and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim Reprod Sci*, v.119, p.305-313, 2010.
- Bencharif D, Amirat-briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz V, 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 semen. *Res Vet Sci*, v.93, p.440-447, 2012.
- Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Silva, LDM.** Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, v.59, p.743-751, 2003.
- Concannon PW, Battista M.** Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk RW, Bonagura JD (Ed.). *Current veterinary therapy X: small animal practice*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 1989. p.1247-1259.
- Derivaux J.** Reprodução dos animais domésticos. Zaragoza: Acribia, 1980. 446p.
- Futino DO, Mendes MCB, Matos MNL, Mondador RG, Lucci CM.** Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.214-220, 2010.



- Günzel-Apel AR.** Fertilitätskontrolle und Samenertragung beim Hund. Hannover: Gustav Fischer Verlag Jena, 1994. p.20-84.
- Hori T, Kaseki H, Fukuhara Y, Oba H, Mizutani T, Kawakami E, Tsutsui T.** Effects of addition of sodium lauryl sulfate on frozen-thawed canine spermatozoa. *J Vet Med Sci*, v.68, p.1125-1128, 2006.
- Madeira VLH, Monteiro CLB, Barbosa CC, Jucá RP, Oliveira AC, Uchoa DC, Silva LDM.** Efeito de diferentes protocolos de descongelamento sobre o sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco em pó (ACP®). *Cienc Anim Bras* v.11, p.845-852, 2010.
- Makloski CL.** Clinical techniques of artificial insemination in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v.42, p.439-444, 2012.
- Martins-bessa A, Rocha A, Mayenco-aguirre A.** Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine sêmen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology*, v.66, p.2047-2055, 2006.
- Peña A, Linde-forsberg C.** Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, p.859-875, 2000.
- Pinto CRF, Kozink DM.** Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa: short communication. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.450-455, 2007.
- Quintela AT, Oliveira IRS, Souza AO, Gusmão AL, Silva AR.** Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm integrity. *Anim Reprod*, v.7, p.70-74, 2010.
- Root-kustritz MV.** The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*, v.68, p.329-337, 2007.
- Schafer-somi S, Aurich C.** Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Anim Reprod Sci*, v.102, p.1-13, 2006.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM, Chirinéa VH, Lopes MD, Souza FF.** Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. *Theriogenology*, v.66, p.456-462, 2006.
- Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM.** Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *Vet J*, v.164, p.244-246, 2002.
- Silva AR, Fontenele-Neto JD, Cardoso RCS, Silva LDM, Chirinéa VH, Lopes MD.** Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. *Cienc Anim Bras*, v.10, p.595-501, 2009.
- Tsutsui T, Hase M, Hori T, Ito T, Kawakami E.** Effects of orvus ES paste on canine spermatozoa longevity after freezing and thawing. *J Vet Med Sci*, v.62, p.533-535, 2000a.
- Tsutsui T, Hase M, Tanaka A, Fujimura N, Hori T, Kawakami E.** Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of orvus ES paste-supplemented egg yolk Tris- fructose citrate. *J Vet Med Sci*, v.62, p.603-606, 2000b.
- Tsutsui T, Mizutani T, Matsubara Y, Toyonaga M, Oba H, Hori T.** Surgical intrauterine insemination with cat semen cryopreserved with Orvus ES paste or sodium lauryl sulfate. *J Vet Med Sci*, v.73, p.259-262, 2011.
- Verstegen JP, Iguer-ouada M, Onclin K.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
- Wittayarat M, Kimura T, Kodama R, Chatdarong K, Techakumphu M, Sato Y, Taniguchi M, Otoi T.** Long-term preservation of chilled canine semen using vitamin c in combination with green tea polyphenol. *Cryo Lett*, v.33, p.318-326, 2012.
-