

CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS DO SÊMEN CANINO REFRIGERADO E CONGELADO, USANDO DOIS DIFERENTES MEIOS DILUENTES

VIVIANE HELENA CHIRINÉA,^{1*} MARIA ISABEL MELLO MARTINS,² FABIANA FERREIRA DE SOUZA,¹ JUSSARA MARIA TEBET,¹ FREDERICO OZANAN PAPA¹ E MARIA DENISE LOPES¹

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ, UNESP, Distrito de Rubião Junior, s/nº, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brasil

² Departamento de Clínica Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, UEL, Caixa Postal 6.001, CEP 86051-900, Campus Universitário, Londrina, PR, Brasil

* Fone/fax: (55) 3811 6249; e-mail: vivichiri@hotmail.com ou repas@fmvz.unesp.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de análise funcional e morfológica, dois meios diluentes – TRIS/frutose/ácido cítrico/glicerol (8 %) (TRIS 8 %) (Morton, 1988 modificado) e um meio comercial (MP50) (PAPA et al., 2002) – para criopreservação de sêmen canino. Colheram-se dez ejaculados de cães adultos, por manipulação digital do pênis. Avaliaram-se as amostras pela motilidade espermática, velocidade espermática, teste hiposmótico, integridade de membrana espermática, morfologia espermática, e análise ultra-estrutural no sêmen fresco (T1), refrigerado (T2) e descongelado (T3). Envasaram-se as amostras diluídas em palhetas francesas de 0,5 mL, com 40 x 10⁶ espermatozoides/palheta e se as mantiveram por sessenta minutos a 5 °C (T2); em seguida, transferiram-nas

para vapor de nitrogênio líquido durante vinte minutos e posteriormente estocadas. O sêmen foi descongelado a 70 °C por 8 segundos. A análise de variância mostrou influência do animal nas diferentes variáveis, com exceção da motilidade espermática e integridade de membrana espermática. Na refrigeração (T2), o meio MP50 apresentou melhores resultados no teste hiposmótico e na integridade de membrana (p<0,05) e no sêmen descongelado (T3) não foi observada diferença significativa entre os meios (p>0,05). A análise ultra-estrutural do sêmen mostrou edema e ondulação da membrana plasmática e acrossomal nas diferentes etapas do processo de criopreservação. Conclui-se que os meios diluentes utilizados mostraram ser semelhantes quanto às características morfofuncionais após a descongelação.

PALAVRAS-CHAVE: Cão, congelação, meio diluente, sêmen.

ABSTRACT

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CANINE COOLED AND FROZEN SEMEN USING TWO DIFFERENT EXTENDERS

The objective of this study was to verify the efficiency of two different extenders: TRIS/Fructose/Citric Acid/Glycerol (8 %) - (TRIS 8 %) (Morton, 1988 modified) and commercial extender - MP50 (PAPA et al., 2002) - for freezing dog semen. Ten ejaculates from different adult dogs were collected by digital manipulation. The samples semen were evaluated for sperm motility and vigor, hypo-osmotic

swelling test, sperm membrane integrity, sperm morphology, ultra structural analysis in three different moments, fresh (T1), cooled (T2) and thawed (T3). The samples were packaged in 0.5 mL French straws with 40 x 10⁶ spermatozoa/straw, and kept at 5 °C for 60 minutes (T2); then frozen in static vapor of nitrogen for the following 20 minutes and immersed in liquid nitrogen until being thawed in 70 °C water

for 8 seconds (T3). By analysis of variance, it would be possible to verify the animal effect on almost all variables observed in this study, except for sperm motility and membrane integrity. For cooled semen (T2), MP50 were significantly better for hypo-osmotic swelling test, sperm membrane integrity ($p < 0.05$) and for thawed semen (T3),

KEY WORDS: Semen, dog, freezing and extender.

INTRODUÇÃO

Vários estudos estão sendo desenvolvidos para determinação das melhores condições para a criopreservação do espermatozóide de cães (STROM et al., 1998; VERSTEGEN et al. 2002; 2005, RIJSSELAERE et al. 2005). Porém, muitos fatores são envolvidos no processo de refrigeração e congelação do sêmen de cães e, ainda hoje, nenhuma metodologia parece ser a ideal para todos os cães e para todos os ejaculados, pois variações intrínsecas às propriedades, como sensibilidade osmótica entre espermatozóide de diferentes cães e ejaculados faz com que a resposta à criopreservação não seja previsível (EILTS, 2005; MINTER & DeLIBERTO, 2005).

Alguns cães apresentam sêmen com uma resistência maior ao processo de criopreservação do que outros. Isso pode ser causado por diferenças genéticas na membrana celular dos espermatozóides, resultando um diferencial na permeabilidade da membrana, com alterações no movimento de água e em formação de gelo intracelular, com morte das células (EILTS, 2005).

Meios diluentes são utilizados para a refrigeração e congelação de sêmen com o intuito de proteger os espermatozóides, conservar a motilidade e fertilidade por um período de tempo, providenciar substrato energético e prevenir efeitos deletérios de mudanças no pH e osmolaridade. Vários diluentes para congelação de sêmen de cão têm sido estudados, alguns com formulações adaptadas de outras espécies, mas a maioria não apresentou ainda resultados satisfatórios.

A taxa de concepção é a melhor maneira de estimar a capacidade fecundante do sêmen canino. No entanto, essa avaliação consome tempo e o nas-

there was no significant difference between extenders. By ultra structural analysis, it was possible to verify swelling plasma and acrosomal sperm membranes in the different stages of freezing process. In conclusion, the extenders showed the same results as to morphofunctional characteristics the semen canine thawed.

cimento de filhotes não desejados. Assim, formas alternativas de avaliação *in vitro* das células espermáticas ainda são necessárias (GRAHAM & MOCÉ, 2005). Apesar da dificuldade de se correlacionar à análise convencional do sêmen com teste de fertilidade *in vivo*, as avaliações *in vitro* que atestam a qualidade seminal permanecem importantes.

Em vista do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características morfológicas e funcionais das células espermáticas caninas, para determinação das perdas resultantes do processo de refrigeração (5 °C) e de congelação (- 196 °C), utilizando-se para isso dois meios diluentes: TRIS/frutose/ácido cítrico/glicerol (8 %) - (TRIS 8 %) (MORTON, 1988), modificado pelo emprego de 0,020 mg de sulfato de amicacina, em substituição a penicilina e estreptomicina, e um meio comercial (MP50) (PAPA et al., 2002).

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se ejaculados de dez cães adultos, com idade entre dois e cinco anos, provenientes de criatórios particulares e com sanidade comprovada. O ejaculado foi colhido por manipulação digital do pênis, sem a presença de uma fêmea em cio.

Dividiram-se as análises morfológicas e funcionais do sêmen em três etapas: sêmen fresco (T1), sêmen refrigerado (T2) e sêmen descongelado (T3).

Avaliações funcionais – motilidade e vigor espermático foram analisados subjetivamente, colocando-se uma gota de sêmen sobre lâmina aquecida (38-40 °C) e recoberta por lamínula. Realizou-se o exame mediante um microscópio de contraste de fase (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), num

aumento de duzentas vezes. O resultado foi expresso em porcentagem (0% a 100 %), para espermatozoides com movimentos progressivos, e um escore de zero a cinco para o vigor, em que o zero representou espermatozoides sem movimento e cinco, espermatozoides com movimentos rápidos e vigorosos.

Concentração espermática – determinada pela contagem das células espermáticas em câmara hematimétrica de “Neubauer”, após diluição do sêmen total em água destilada (1:20).

Teste hiposmótico – realizado segundo a técnica descrita por INAMASSU et al. (1999), consistiu em misturar 0,1 mL do sêmen em 0,9 mL da solução hiposmótica (150 mOsmol). Utilizou-se uma solução isosmótica (300 mOsmol) como controle. O resultado foi dado em porcentagem, subtraindo a quantidade de espermatozoides com cauda enrolada na solução de 300 mOsmol da quantidade de espermatozoides com cauda enrolada da solução de 150 mOsmol.

Avaliações morfológicas – morfologia espermática: procedeu-se a esfregaços do sêmen em lâminas, corados pelo método de Karras modificado (PAPA et al., 1986). Avaliaram-se duzentas células de cada esfregaço, classificando-se as alterações espermáticas de acordo com MIES FILHO (1987). Os resultados foram expressos em porcentagem de defeitos maiores, defeitos menores e células normais.

Sondas fluorescentes: a coloração fluorescente foi realizada de acordo com a técnica descrita por HARRISON & VICKERS (1990), e adaptada ao cão por CUNHA et al. (1996). Contaram-se duzentas células, as quais classificaram-se como: células com membrana íntegra (coradas em verde fluorescente) e células com membrana lesada (coradas em vermelho ou em verde fluorescente e vermelho).

Microscopia de transmissão: centrifugou-se uma amostra do ejaculado a 800 x g por quinze minutos. Desprezou-se o sobrenadante, fixando-se o *pellet* em glutaraldeído a 2,5 %. mantiveram-se as amostras sob refrigeração a 5 °C, até o momento do processamento. O material foi examinado ao microscópio eletrônico de transmissão (modelo

Philips CM 100) e fotodocumentado.

Congelação: após as análises da etapa T1, dividiu-se o ejaculado em duas amostras iguais, diluindo-se cada parte (1:1) em meio TRIS sem glicerol (TRIS S/G), e centrifugada a 800 xg por dez minutos. Desprezaram-se os sobrenadantes e ressuspendeu-se cada *pellet* em TRIS 8 % ou em meio comercial MP50 (PAPA et al., 2002), contendo 3 % de glicerol e 2% de dimetil formamida.

Envasou-se o sêmen em palhetas francesas de 0,5 mL, contendo 80×10^6 espermatozoides/mL, o qual foi transferido para um refrigerador programado a 5 °C (MINITUB) por sessenta minutos (T2). Posicionaram-se, então, as palhetas numa grade, dentro de uma caixa térmica, contendo nitrogênio líquido, a 6 cm do nível do líquido, onde foram mantidas durante vinte minutos, e posteriormente armazenadas em botijão criogênico. Realizou-se a descongelação a 70 °C por oito segundos (T3).

Análise estatística – realizada por meio da análise de variância, levando-se em consideração o efeito animal e o efeito tratamento. Compararam-se as médias de cada tratamento pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5 %.

Estabeleceram-se as perdas decorrentes do processo de refrigeração e congelamento do sêmen apenas para as variáveis motilidade espermática e integridade de membrana, representando as características funcional e morfológica.

RESULTADOS

Os resultados das análises morfológicas e funcionais do sêmen fresco (T1) apresentaram valores dentro da média para a espécie e estão descritas nas Tabelas 1 e 2.

Ao se comparar os valores de sêmen fresco com as amostras refrigeradas, constataram-se uma diferença significativa entre todas as variáveis analisadas ($p < 0.05$), com exceção do vigor das amostras diluídas com o meio MP50, e defeitos maiores das amostras diluídas com meio TRIS 8 %.

Durante o processo de refrigeração observou-se uma perda de 16,7 % em relação à motilidade

espermática, quando se utilizou o meio à base de TRIS 8 %, e de 13,9 % quando se usou o meio MP50 (Tabela 3). No teste de integridade de membrana espermática, houve um decréscimo de 48,9% entre o T1 e T2 no meio TRIS 8 % e de 20,3 % no meio MP50. Nessa fase do processo as perdas foram maiores no meio TRIS 8 % (Tabela 4).

A comparação entre os dois meios diluentes na fase de refrigeração (T2) mostrou superioridade do meio MP50 ($p < 0,05$) para o teste hiposmótico e para integridade de membrana espermática. Não houve diferença significativa entre as demais avaliações (Tabelas 1 e 2).

TABELA 1. Média \pm desvio padrão da motilidade espermática, vigor espermático e teste hiposmótico de dez ejaculados de cães após a colheita (T1), pós-refrigeração (T2) e descongelação (T3) em dois meios diluidores: TRIS 8 % (M1) e em meio MP50 (M2), Botucatu, SP, 2004.

Tratamento	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Teste hiposmótico (%)
T1	89,5 \pm 3,7 ^a	4,6 \pm 0,5 ^a	82,9 \pm 7,1 ^a
T2 M1	74,5 \pm 8,3 ^b	3,6 \pm 0,6 ^{b,c}	38,4 \pm 14,5 ^b
T2 M2	77,0 \pm 10,1 ^b	4,0 \pm 0,6 ^{a,b}	63,3 \pm 11,4 ^c
T3 M1	67,0 \pm 13,2 ^{b,c}	3,3 \pm 0,5 ^c	25,2 \pm 7,1 ^d
T3 M2	61,0 \pm 10,7 ^c	3,3 \pm 0,4 ^c	34,1 \pm 14,2 ^d

* Médias seguidas de letras diferentes, numa mesma coluna, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

TABELA 2. Média \pm desvio padrão dos resultados da integridade das membranas espermáticas (I.M.E.) e morfologia espermática de dez ejaculados de cães após a colheita (T1), após a refrigeração (T2) e após a descongelação (T3) em meio TRIS 8 % (M1) e em meio MP50 (M2). Botucatu, SP, 2004.

Tratamento	I.M.E. (%)	Morfologia espermática		
		Normais (%)	Maior (%)	Menor (%)
T1	82,7 \pm 9,2 ^a	85,4 \pm 4,1 ^a	9,7 \pm 3,1 ^a	4,9 \pm 2,4 ^{a,b}
T2 M1	42,3 \pm 14,6 ^b	74,2 \pm 11,5 ^b	19,1 \pm 7,5 ^{a,b}	6,7 \pm 6,2 ^b
T2 M2	65,9 \pm 15,8 ^c	69,7 \pm 15,0 ^b	20,5 \pm 12,2 ^b	9,8 \pm 6,5 ^{b,c}
T3 M1	33,3 \pm 14,9 ^b	57,6 \pm 8,6 ^c	27,2 \pm 6,8 ^{b,c}	15,2 \pm 6,3 ^c
T3 M2	37,7 \pm 10,7 ^b	54,5 \pm 11,4 ^c	32,5 \pm 8,5 ^c	13,0 \pm 5,7 ^c

* Médias seguidas de letras diferentes, numa mesma coluna, diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na avaliação pós-descongelação (T3) não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dois meios estudados para as diferentes variáveis (Tabelas 1 e 2). Quando foram examinadas as perdas de-

correntes do processo de congelamento para as variáveis motilidade e integridade de membrana, constatou-se uma perda de 25,1 %, para o meio TRIS 8 %, e 31,8 % para o meio MP50, para motilidade

(Tabela 3). Para a integridade de membrana, as perdas foram de 59,7 % e 54,4 %, respectivamente, para TRIS 8 % e MP50 (Tabela 4).

Em relação à microscopia eletrônica de transmissão, as lesões observadas nos espermatozoides do *in natura* foram edema e ondulação da membrana plasmática (Figura 1 – A). Independente do meio utilizado, durante o processo de refrigeração

(Figura 1 – B e C), o exame ultra-estrutural dos espermatozoides revelou edema e ondulação da membrana plasmática, porém a membrana acrossomal externa apresentou-se íntegra. Após o processo de congelação/dcongelação (Figura 1 – D e E), verificaram-se alterações severas na membrana plasmática e acrossomal externa, ambas com edema, ondulação, e perda de conteúdo acrossomal.

TABELA 3. Diferença entre os valores percentuais ajustados* da motilidade espermática nos cinco tratamentos: sêmen fresco (T1), sêmen refrigerado em meio TRIS 8 % (T2M1), sêmen refrigerado em meio MP50 (T2M2), sêmen congelado em meio TRIS 8 % (T3M1), e sêmen congelado em meio MP50 (T3M2). Botucatu, SP, 2004.

Linha (L _n) Coluna (C _n)	T2M1 (74,5)	T2M2 (77,0)	T3M1 (67,0)	T3M2 (61,0)
T1 (89,5)	- 16,7%	- 13,9%	- 25,1%	- 31,8%
T2M1 (74,5)	—	+ 3,3%	- 10,0%	—
T2M2 (77,0)	—	—	—	- 20,7%
T3M1 (67,0)	—	—	—	- 8,9%

$$* Y = \left(\frac{Ln \times 100}{Cn} \right) - 100$$

TABELA 4. Diferença entre os valores percentuais ajustados* da integridade das membranas espermáticas nos cinco tratamentos: sêmen fresco (T1), sêmen refrigerado em meio TRIS 8 % (T2M1), sêmen refrigerado em meio MP50 (T2M2), sêmen congelado em meio TRIS 8 % (T3M1), e sêmen congelado em meio MP50 (T3M2). Botucatu, SP, 2004.

Linha (L _n) Coluna (C _n)	T2M1 (42,2)	T2M2 (65,9)	T3M1 (33,3)	T3M2 (37,7)
T1 (82,7)	- 48,9%	- 20,3%	- 59,7%	- 54,4%
T2M1 (42,2)	—	+ 56,1%	- 21,0%	—
T2M2 (65,9)	—	—	—	- 42,7%
T3M1 (33,3)	—	—	—	+ 13,2%

$$* Y = \left(\frac{Ln \times 100}{Cn} \right) - 100$$

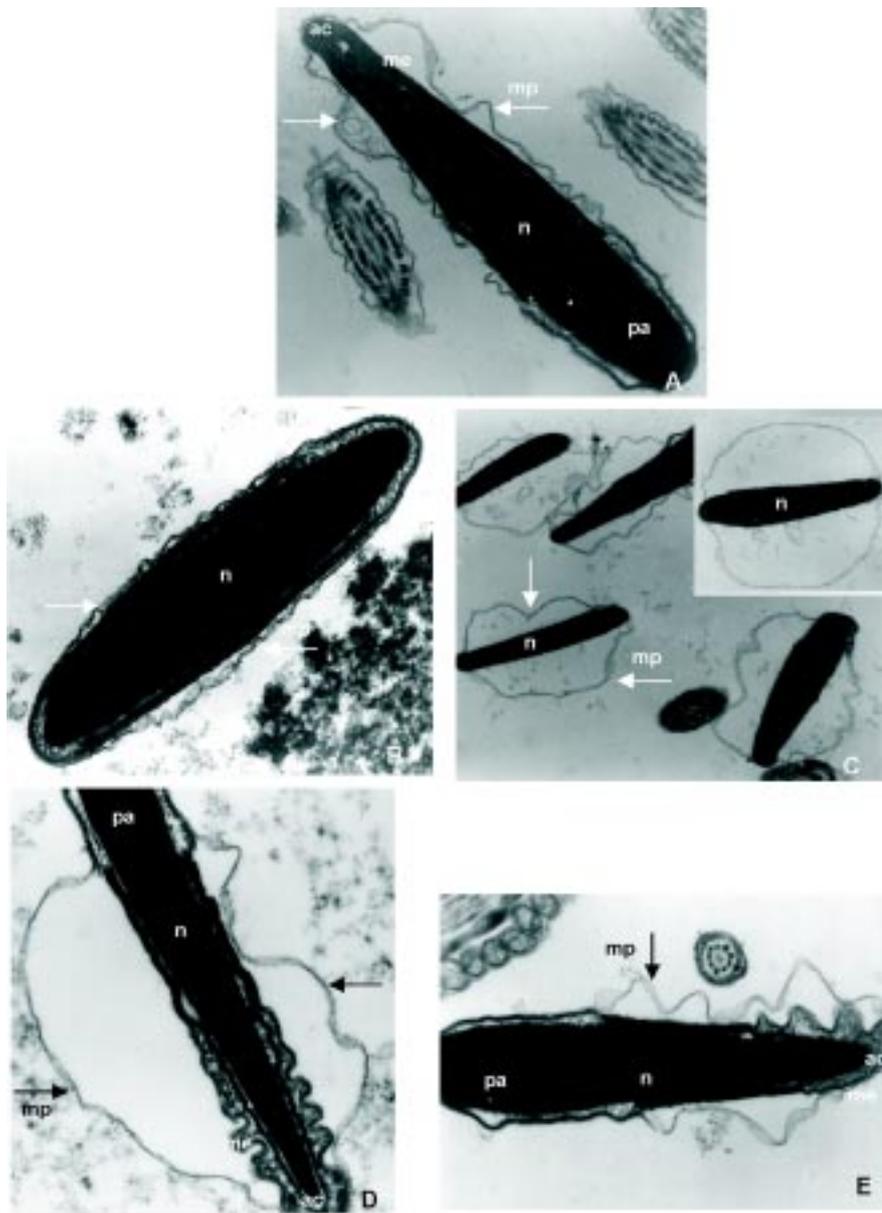


FIGURA 1. Fotomicrografias de espermatozoides caninos *in natura* (A), refrigerados com meio TRIS 8 % –T2M1- (B) e meio MP50 –T2M2- (C), e descongelados com TRIS 8 % –T3M1- (D) e MP50 –T3M2- (E). Botucatu, SP, 2004.

(A) Corte longitudinal de espermatozóide com membrana plasmática (mp) edemaciada e ondulada (setas). Membrana acrossomal externa (me) íntegra. (8.400 X).

(B) Corte oblíquo de espermatozóide com membrana plasmática (mp) edemaciada e ondulada (setas). (11.500 X).

(C) Corte transversal de espermatozóide com membrana plasmática (mp) edemaciada (setas) e membrana acrossomal externa íntegra. (3.400 X).

(D) Corte longitudinal de espermatozóide com membrana plasmática (mp) edemaciada e ondulada, e membrana acrossomal externa (me) com edema e ondulações. (8.400 X).

(E) Corte longitudinal de espermatozóide com membrana plasmática (mp) edemaciada e ondulada, e membrana acrossomal externa (me) com edema e ondulações. (8.400 X).

n = núcleo; mp = membrana plasmática; me = membrana acrossomal externa; ac = acrossomo; pa = região pós-acrossomal.

DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi comparar dois meios diluentes, utilizados no processo de congelamento de sêmen, um deles considerado padrão para a espécie canina, o TRIS 8 %, e o outro um meio comercial (MP50), por meio de uma combinação de testes. Avaliaram-se os seguintes aspectos: motilidade espermática, morfologia espermática, *status* acrossomal, integridade de membrana e análise ultra-estrutural. Apesar dos inúmeros relatos na literatura, não é possível avaliar completamente a interação entre a célula espermática e o trato reprodutivo das fêmeas, durante o transporte espermático, até o local da fecundação (LARSSON & RODRIGUES-MARTÍNEZ, 2000). Embora existam muitos métodos de avaliação da célula espermática, nenhum teste é capaz de avaliar, isoladamente, o potencial fertilizante de um ejaculado. Entretanto, a utilização de uma combinação de vários testes possibilita avaliar possíveis reprodutores, doses de sêmen, métodos de preservação da célula espermática e coordenar o manejo reprodutivo.

Em vista da variação inerente dos ejaculados e da tendência da fertilidade dos machos variarem com o tempo, é difícil prever com segurança a fertilidade, ou a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen, utilizando apenas testes *in vitro* esporádicos (EILTS, 2005; MINTER & DeLIBERTO, 2005). Portanto, são necessários estudos longitudinais, nos quais a fertilidade *in vivo* e *in vitro* seja monitorada periodicamente.

O meio comercial, MP50, mostrou melhores resultados durante a etapa de refrigeração. Esses resultados, possivelmente, são devido à presença de dois crioprotetores, neste meio: glicerol e dimetilformamida. Além disso, neste meio a porcentagem de glicerol é menor quando comparado com o meio TRIS 8 %, portanto, menos tóxico.

Quando foram examinadas as perdas na porcentagem de motilidade espermática e integridade de membrana nessa fase, os resultados mostraram uma superioridade da ordem de 3,3 % e 56,1 %, respectivamente, do meio comercial, sobre o TRIS

8 %. O meio comercial MP50, além de dois crioprotetores, contém três açúcares em sua composição, lactose, glicose e frutose. A lactose possui um peso molecular mais alto que a glicose e uma baixa permeabilidade, limitando seu uso como substrato de energia, funcionando, provavelmente, mais como um crioprotetor extracelular. CHIRINÉIA et al. (2003), utilizando diferentes suplementações de açúcares no meio diluente para congelamento de sêmen canino, demonstraram uma superioridade do dissacarídeo lactose em relação aos demais. Isto poderia explicar os melhores resultados obtidos pelo meio MP50 nessa fase.

Durante a etapa de descongelamento, não foi observada diferença entre os meios diluentes para as características examinadas. Contudo, entre as etapas de refrigeração e congelamento o sêmen congelado no meio MP50 perdeu 42,7 % na integridade de membrana e o no meio TRIS 8 %, apenas 21,0 %, o que permitiu a igualdade entre os meios na fase de descongelamento. O TRIS 8 %, além de ter um sistema tampão adequado, contém uma porcentagem de glicerol mais alta (8 %), necessária para a proteção da membrana espermática durante o processo de congelamento.

A microscopia eletrônica de transmissão foi considerada, neste estudo, um teste descritivo e qualitativo, identificando lesões da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação. A criopreservação causa efeitos severos na viabilidade do espermatozoide diminuindo sua função (BURGESS et al., 2001). Efeitos diretos podem matar o espermatozoide ou torná-lo incapaz de fertilizar, devido a lesões do acrossoma, enquanto os efeitos indiretos podem reduzir a longevidade espermática pela alteração estrutural da membrana plasmática. Embora o processo de congelamento cause lesões severas da membrana plasmática e acrossomal, vistas na análise ultra-estrutural e caracterizadas por edema e ondulações, rupturas destas membranas não foram observadas neste estudo, como já descritas em outros estudos (BURGESS et al., 2001; STROM et al., 1998).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que durante o processo de refrigeração houve superioridade do meio comercial MP50 relacionada às alterações funcionais e morfológicas, enquanto que na avaliação pós-descongelamento não houve diferença entre os meios diluentes testados. Estudos adicionais, comparando resultados de fertilidade *in vivo* entre os meios, contribuirão para elaboração de um meio diluente ideal para a espécie canina.

REFERÊNCIAS

- BURGESS, C. M.; BREDL, J. C. S.; PLUMMER, J. M.; ENGLAND, G. C. W. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 57, 357-363, 2001.
- CHIRINÉA, V. H.; MARTINS, M. I. M.; SOUZA, F. F.; TEBET, J. M.; LOPES, M. D.; TRINCA, L. A. Efeito da suplementação de diferentes açúcares no meio de congelamento de sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 361-363, 2003.
- CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. D.; ZUCCARI, C. E. S. N. Padronização da técnica fluorescente para avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996. Campo Grande, Brasil. **Proceedings...** Mato Grosso, 1996. p. 411.
- EILTS, B. E. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 64, p. 685-691, 2005.
- GRAHAM, J. K.; MOCE, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 492-504, 2005.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.
- INAMASSU, A.; UECHI, E.; LOPES, M. D. Viabilização do teste hiposmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 302-304, 1999.
- LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 327-336, 2000.
- MIES FILHO, A. Inseminação artificial nos cães. In: **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. p. 750.
- MINTER, L. J.; DELIBERTO, T. J. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, p. 1898-1912, 2005.
- MORTON, D. B. Artificial insemination with frozen semen in the dog: principles of DNA fingerprinting. In: JONES D.E. and JOSHUA J.O. (Eds.). **Reproductive clinical problems in the dog**. Bristol: Wright and Sons Ltd., 1988. p. 169-186.
- PAPA F. O.; ZAHN F. S.; DELL'AQUA JR, J. A.; ALVARENGA, M. A. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 184-186, 2002.
- PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; BICUDO, S. D.; LOPES, M. D.; RAMIRES, P. R. N. Coloração espermática segundo Karras modificado pelo emprego do Barbatimão (*Sthyphnodendrum barbatiman*). In: CONGRESSO DE BIOLOGIA CELULAR, 3., 1986. Rio de Janeiro, Brasil. **Anais...** Rio de Janeiro, 1986. p. 86.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, 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. 706-719, 2005.

STROM HOLST, B.; ROTA, A.; ANDERSEN BERG, K.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation content of selected elements. **Reproduction Domestic Animal**, v. 33, p.77-82, 1998.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers

in andrology research and veterinary practice. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, Foz do Iguaçu, Brasil. **Proceedings...** Foz do Iguaçu, 2002. p. 149-179.

VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk Tris-glucose extender: In vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v. 64, p. 720-733, 2005.

Protocolado em: 5 maio 2006. Aceito em: 4 ago. 2006.