

CONGELAÇÃO DE SÊMEN CANINO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GEMA DE OVO E GLICEROL EM DILUIDORES À BASE DE TRIS E ÁGUA DE COCO

CANINE SEMEN'S FREEZE WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF EGG YOLK AND GLYCEROL IN TRIS AND COCONUT WATER EXTENDERS

Alexandre Rodrigues Silva¹ Rita de Cássia Soares Cardoso² Lúcia Daniel Machado da Silva³

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi comparar os diluidores à base de água de coco e à base de Tris na congelação do sêmen canino, utilizando-se diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol. Cães Pastores Alemães (n=5) tiveram seu sêmen coletado por manipulação digital. Sua fração espermática foi avaliada quanto aos parâmetros macro e microscópicos e misturada para a formação de um pool de esperma que foi diluído em água de coco ou Tris, acrescidos de gema de ovo (10 ou 20%) e glicerol (4, 6 ou 8%). Em seguida, congelado pelo método de NUNES *et al.* (1997), sendo descongelado a 37°C após uma semana. Observou-se uma superioridade do diluidor à base de Tris na conservação dos parâmetros vigor ($2,3 \pm 0,8$), alterações espermáticas totais ($14,8 \pm 5,1\%$) e secundárias ($14,4 \pm 5,5\%$) no par onde os diluidores foram acrescidos de 20% de gema de ovo e 6% de glicerol. Nos demais protocolos, não se evidenciaram diferenças significativas entre os dois diluidores, em nenhum dos parâmetros observados. Esses resultados sugerem uma superioridade do diluidor à base de Tris em relação ao diluidor à base de água de coco na congelação do sêmen canino, no uso dos mesmos acrescidos de 20% de gema de ovo e 6% de glicerol.

Palavras-chave: sêmen, cão, congelação, água de coco, Tris, glicerol, gema de ovo.

SUMMARY

The aim of the present research was to compare the efficiency of coconut water and Tris extenders on canine semen freezing. The semen from 5 German Shepherd dogs was collected by digital manipulation. The spermatic fraction of different dogs was evaluated about its macro and microscopic parameters and mixed in a pool. It was extended in coconut water or Tris, added of egg yolk (10 or 20%) and glycerol (4, 6 or 8%). Then, it was frozen by the method of NUNES *et al.* (1997) and thawed at 37°C

after one week. A Tris extender superiority was shown at the conservation of vigor (2.3 ± 0.8), total ($14.8 \pm 5.1\%$) and secondary ($14.4 \pm 5.5\%$) spermatic defects in the protocols with 20% of egg yolk and 6% of glycerol. In all other protocols, there were no significant differences for the observed parameters. These results suggest a superiority of Tris extender over the coconut water extender on canine semen freeze, in the use of them added of 20% of egg yolk and 6% of glycerol.

Key words: semen, dog, freeze, coconut water, Tris, glycerol, egg yolk.

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial, utilizando sêmen congelado, pode vir a tornar-se uma arma de grande eficácia nas mãos de médicos veterinários e criadores que praticam o melhoramento genético em cães (LEES & CASTLEBERRY, 1977; SOUZA, 1985). Seu desenvolvimento resguarda os animais do estresse causado pelo transporte para fins de acasalamento e do risco de eventuais doenças transmissíveis durante a cópula, bem como favorece a preservação de material de alto valor genético. Por outro lado, os testes de congelação de gametas e a posterior fertilização *in vivo* ou *in vitro* podem servir como base para as pesquisas em espécies canídeas em extinção, como o Lobo Guará brasileiro (*Chrysocyon brachyurus*) e a Raposinha do Campo (*Pseudalopex sp.*).

¹Médico Veterinário, Mestrando em Ciências Veterinárias, FAVET/UECE. Rua Aracati, 69, Benfica, 60020-240 Fortaleza, CE. E-mail: legio2000@yahoo.com. Autor para correspondência.

²Médico Veterinário, Mestrando em Ciências Veterinárias, FAVET/UECE.

³Médico Veterinário, Doutor em Ciências Veterinárias, Professor FAVET/UECE.

O sêmen canino pode manter-se congelado por diversos anos, permanecendo potencialmente fecundante quando descongelado e utilizado em IA. No entanto, para que se obtenha sucesso com a IA é estritamente necessário o uso de um bom diluidor que contenha nutrientes como uma reserva de energia, sirva como tampão contrapondo as alterações do pH, mantenha a pressão osmótica e a concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos do sêmen, previna o crescimento de bactérias, proteja a célula do choque térmico durante o processo de resfriamento, e possua crioprotetores que reduzam os danos às células espermáticas durante a congelção e posterior descongelção (CONCANNON & BATTISTA, 1989).

A congelção do sêmen do cão foi primeiramente notificada por ROWSON (1954), mas um maior aprofundamento no estudo dessa biotécnica só foi possível a partir da adaptação para a espécie canina de um meio diluidor à base de Tris-gema-glicerol (FOOTE, 1964; ANDERSEN, 1975), primeiramente desenvolvido para a congelção do sêmen bovino (DAVIS *et al.*, 1963).

A primeira comparação entre diluidores do sêmen de cães foi feita por FOOTE (1964). Desde então, diversas pesquisas foram empreendidas a fim de avaliarem-se diluidores utilizados para a congelção do sêmen do cão, como: o Biociphos (SILVA & VERSTEGEN, 1995); o Tris (RODRIGUES, 1997) e o Laiciphos 478 (SILVA & VERSTEGEN, 1995). Mais recentemente, foram desenvolvidos trabalhos relacionados ao uso de um diluidor à base de água de coco para a congelção do sêmen canino (MONTEZUMA JÚNIOR *et al.*, 1994); diluidor esse já testado no sêmen fresco de caprinos (RODRIGUES *et al.*, 1994) e ovinos (SOUZA *et al.*, 1994), nos quais foram obtidos valores de motilidade espermática de 21,1 e 59,2%, respectivamente, no sêmen diluído em água de coco sob a forma de gel, após 120 minutos de incubação a 37°C; em suínos (TONIOLLI & MESQUITA, 1990), tendo sido verificada uma taxa de 86% de parição no uso do sêmen diluído em água de coco estabilizada; e em capotes (MILITÃO *et al.*, 1994), nos quais foi alcançada uma taxa de 88% de eclosão de ovos postos por galinhas inseminadas, utilizando-se o referido diluidor.

A água de coco é uma solução natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, fornecendo os nutrientes necessários para a conservação de células espermáticas (BLUME & MARQUES Jr., 1994). A água de coco *in natura*, após corrigidos a osmolaridade e o pH para o sêmen da espécie respectiva,

poderia representar um diluidor eficiente, com uma relação custo/benefício favorável aos programas de inseminação artificial no Brasil, sem custos adicionais com diluidores importados (NUNES & COBARNOUS, 1995).

O objetivo do presente trabalho foi comparar o diluidor à base de água de coco com o diluidor à base de Tris, na conservação da qualidade espermática durante o processo de congelção do sêmen canino, utilizando-se diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 5 cães machos da raça Pastor Alemão com média de 4,5 anos, pertencentes ao canil da Polícia Militar do Ceará, submetidos às mesmas condições de manejo alimentar e sanitário. Os animais foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial e receberam água à vontade. Semanalmente, coletou-se aleatoriamente, de acordo com a disponibilidade dos 5 animais experimentais, o sêmen de dois ou três cães através da técnica de manipulação digital, no qual se separou o sêmen em suas três frações (CHRISTIANSEN, 1986), com o auxílio de tubos graduados e um funil. A segunda fração, rica em espermatozoides (sptz), foi retida para avaliação e posterior congelção. Devido à coleta ter sido realizada no canil da PMCe, o sêmen foi imediatamente avaliado e acondicionado em banho-maria a uma temperatura de aproximadamente 37°C por cerca de 30 minutos, durante o transporte ao laboratório, onde se procedeu o processamento.

As características macroscópicas (aspecto, volume, viscosidade e cor) foram avaliadas logo após cada coleta de sêmen. Avaliaram-se também a motilidade (percentagem de sptz móveis) e o vigor espermático, qualificado em escala de 0 a 5 (PLATZ & SEAGER, 1977), através da microscopia ótica (100 e 400x). Para a análise morfológica dos sptz, fez-se um esfregaço de sêmen corado pelo método Diff-Quick (CONCANNON & DIGREGORIO, 1986) modificado, avaliado através da microscopia ótica (400x). As alterações morfológicas foram classificadas em primárias, quando relacionadas a problemas de produção espermática no testículo; e secundárias, quando relacionadas a problemas de maturação espermática ou oriundos da manipulação do sêmen (SEAGER, 1986). A concentração espermática foi determinada através de espectrofotometria (CARDOSO *et al.*, 1997).

O diluidor à base de água de coco consistiu em uma solução composta por 50% de água de coco, 25% de água destilada e 25% de citrato de

sódio a 5% (NUNES & COBARNOUS, 1995). O diluidor à base de Tris caracterizava-se pela solução composta por 3,028g de Tris-hidroximetilaminometano, acrescida de 1,78g de ácido cítrico e 1,25g de frutose, diluídos em 100ml de água destilada (RODRIGUES, 1997). A osmolaridade dos diluidores foi ajustada para em torno de 305mOsm/L. Em seguida, foram adicionados 10 ou 20% de gema de ovo e 4, 6 ou 8% de glicerol aos diluidores, constituindo-se os protocolos a serem testados. Os diluidores foram fracionados em duas porções. A primeira porção foi adicionada ao sêmen a 37°C e não continha glicerol. A segunda continha o dobro da concentração final de glicerol desejada, sendo adicionada ao sêmen a 4°C.

Após análise individual, as frações espermáticas obtidas no mesmo dia foram misturadas, dando origem a um *pool* de esperma (n=5 por protocolo testado), o qual variava aleatoriamente quanto aos cães doadores, a cada nova congelamento. O *pool* de esperma foi diluído conforme o protocolo experimental adotado e, em seguida, processado segundo o método de NUNES *et al.* (1997). Esse método consistiu em fazer uma primeira diluição a 37°C, seguida de um período de resfriamento até que a amostra atingisse 4°C, quando foi feita a segunda diluição e o envase em palhetas de 0,5 ml. Por fim, foram feitas a exposição das palhetas ao vapor de nitrogênio a -60°C por 5 minutos e o acondicionamento em botijão criobiológico a -196°C. Após uma semana, fez-se a descongelamento em banho-maria a 37°C (SILVA *et al.*, 1998), procedendo-se novas avaliações de motilidade, vigor e alterações morfológicas espermáticas.

Para a determinação da média e desvio padrão dos diferentes parâmetros estudados, foi utilizada a estatística descritiva. Os protocolos utilizados foram agrupados dois a dois, sendo que, em cada par, variavam apenas os diluidores, permanecendo constantes as concentrações de gema de ovo e glicerol. Para fins de comparação dos parâmetros de motilidade, vigor e alterações morfológicas, dentro de cada par, foi aplicado o teste de Whitney-Mann, sendo os resultados considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Macroscopicamente, a segunda fração dos ejaculados apresentou cor branco opalescente e viscosidade leitosa. Essas características, associadas aos parâmetros microscópicos expressos na tabela 1, mostram que o sêmen fresco estava dentro da normalidade para a espécie canina (CHRISTHIANSEN, 1986). Os valores obtidos permitiram qualificar os

Tabela 1 - Avaliação do sêmen a fresco dos cães utilizados no experimento.

Parâmetros avaliados	Média	±	DP
Volume da 2ª fração (ml)	3,2	±	1,4
Concentração (nº de sptz x 10 ⁶ /ml)	719,4	±	314,5
Motilidade (%)	95,7	±	5,6
Vigor (0 - 5)	4,8	±	0,4
Alterações morfológicas totais (%)	24,7	±	15,1
Alterações Primárias (%)	3,1	±	3,8
Alterações Secundárias (%)	21,5	±	13,9

ejaculados como excelentes, possibilitando sua utilização no processo de congelamento (DOBRINSKY *et al.*, 1993; SILVA & VERSTEGEN, 1995).

Para cada protocolo, foram realizadas 5 repetições, totalizando um número de 60 congelamentos de sêmen canino ao final do experimento. Os resultados da análise microscópica do sêmen após descongelamento encontram-se expressos na tabela 2.

Nos pares de protocolos de diluição testados, dentre os quais a única variável foram os diluidores à base de água de coco ou de Tris, foram observadas diferenças significativas apenas no par em que os diluidores foram acrescidos de 20% de gema de ovo e 6% de glicerol (AC.20.6 e T.20.6). Neste par, o diluidor à base de Tris promoveu uma melhor conservação do vigor espermático, notando-se também uma menor incidência de alterações morfológicas totais e secundárias. É provável ter havido uma atuação combinada do Tris, gema de ovo e glicerol nessas concentrações, superior à atuação do grupo formado pelo diluidor à base de água de coco. RAVASZOVA *et al.* (1996) sugerem a utilização de 6% de glicerol em um diluidor à base Tris, o qual, segundo ANDERSEN (1972), FARSTAD & ANDERSEN-BERG (1989) e LINDE-FORSBERG & FORSBERG (1989) deve conter uma concentração final de gema de ovo em torno de 20%, para que haja uma proteção eficaz das células espermáticas durante o processamento, o que poderia justificar a melhor atuação do diluidor à base de Tris no referido par de protocolos.

Evidenciou-se uma maior incidência de alterações primárias espermáticas no uso do diluidor T.20.8, quando comparado ao AC.20.8. Entretanto, essas alterações não receberam influência dos diluidores, visto serem oriundas de problemas causados durante a produção espermática no testículo do cão (SEAGER, 1986).

Segundo ENGLAND (1993), a motilidade espermática é o principal parâmetro microscópico avaliado no sêmen descongelado para se determinar

Tabela 2 - Motilidade, vigor e alterações morfológicas espermáticas no sêmen canino após a descongelamento, utilizando-se diluidores à base de água de coco (AC) e Tris (T), com diferentes concentrações de gema de ovo (10 ou 20%) e glicerol (4, 6 ou 8%) (Comparações entre protocolos dentro de um mesmo par).

Protocolos	Motilidade (%)	Vigor (0 - 5)	Alterações morfológicas (%)		
			Primárias	Secundárias	Totais
AC.10.4*	9,0 ± 10,3 ^a	1,4 ± 1,5 ^a	0,2 ± 0,4 ^a	29,0 ± 3,9 ^a	29,2 ± 3,7 ^a
T.10.4*	38,0 ± 25,6 ^a	1,8 ± 1,0 ^a	0,8 ± 0,8 ^a	26,0 ± 14,7 ^a	26,8 ± 14,5 ^a
AC.10.6*	11,0 ± 12,5 ^a	1,0 ± 1,0 ^a	1,2 ± 2,7 ^a	34,4 ± 10,2 ^a	35,6 ± 12,7 ^a
T.10.6*	34,0 ± 27,0 ^a	2,0 ± 1,5 ^a	1,8 ± 2,7 ^a	19,2 ± 23,2 ^a	23,0 ± 21,1 ^a
AC.10.8*	6,0 ± 8,2 ^a	0,6 ± 0,9 ^a	2,0 ± 4,5 ^a	28,2 ± 12,9 ^a	30,2 ± 16,6 ^a
T.10.8*	28,0 ± 19,2 ^a	2,6 ± 1,6 ^a	1,4 ± 1,7 ^a	30,6 ± 11,9 ^a	31,4 ± 13,4 ^a
AC.20.4*	19,0 ± 23,0 ^a	1,2 ± 0,8 ^a	0,8 ± 1,3 ^a	24,6 ± 14,7 ^a	25,4 ± 15,3 ^a
T.20.4*	46,0 ± 13,4 ^a	1,6 ± 0,8 ^a	1,6 ± 1,7 ^a	22,0 ± 8,1 ^a	23,6 ± 7,1 ^a
AC.20.6*	14,0 ± 20,4 ^a	0,8 ± 0,4 ^a	0,2 ± 0,4 ^a	27,6 ± 6,1 ^a	27,8 ± 6,1 ^a
T.20.6*	39,0 ± 23,0 ^a	2,3 ± 0,8 ^b	0,4 ± 0,9 ^a	14,4 ± 5,5 ^b	14,8 ± 5,1 ^b
AC.20.8*	18,8 ± 20,9 ^a	1,8 ± 0,4 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	24,6 ± 10,9 ^a	24,6 ± 10,9 ^a
T.20.8*	35,0 ± 16,6 ^a	2,1 ± 0,4 ^a	2,2 ± 2,1 ^b	38,0 ± 11,8 ^a	40,2 ± 12,3 ^a

Letras diferentes na mesma coluna, dentro do mesmo par, implicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

* n=5

o sucesso no processo de congelamento. Nesse contexto, não tendo sido evidenciadas diferenças dentro dos pares de protocolos quanto a este parâmetro, é sugestivo que os dois diluidores tenham uma eficiência semelhante na conservação do mesmo, durante a congelamento do sêmen do cão, em qualquer das combinações testadas.

De um modo geral, a motilidade espermática verificada no uso do diluidor à base de Tris nos diferentes protocolos está abaixo dos valor de 60% de sptz móveis obtido por FARSTAD & ANDERSEN-BERG (1989), MORTON & BRUCE (1989), e SILVA & VERSTEGEN (1995) no uso do mesmo diluidor base para o sêmen do cão. Provavelmente, o período de transporte do sêmen desde o canil, onde foi feita a coleta, até o laboratório, acarretou uma demora no início do processamento, o que pode ter diminuído as reservas metabólicas dos sptz, tornando-os mais suscetíveis aos danos oriundos do resfriamento, congelamento e descongelamento.

Segundo MONTEZUMA Jr. *et al.* (1994), a água de coco é um meio que pode ser utilizado na congelamento do sêmen de cães. Esses autores obtiveram valores em torno de 50% de sptz móveis após a descongelamento. Entretanto, sua metodologia de congelamento preconizava o início do processamento do sêmen imediatamente após a coleta.

A motilidade espermática média pós-descongelamento, obtida no presente experimento, com

o uso dos diferentes protocolos com o diluidor à base de água de coco não aconselha a utilização do sêmen em inseminações artificiais pois, segundo CONCANNON & BATTISTA (1989), necessita-se de pelo menos 30% de sptz móveis.

Tal qual o Tris, a ação da água de coco como diluidor para o sêmen de cães pode ter sido prejudicada pela demora no início do processamento. Dessa forma, é possível que modificações na metodologia adotada, como o início imediato do processamento após a coleta, venham a contribuir para o sucesso da congelamento utilizando-se ambos os diluidores testados.

Outro fator importante a ser considerado é a resistência individual de alguns cães ao dano espermático oriundo do processo de congelamento (DAVIES, 1982), o que pode ter exercido alguma influência sobre a qualidade dos diferentes *pool* de esperma utilizados nos protocolos de diluição testados, visto ter sido observada através dos altos valores

de desvio padrão uma grande heterogeneidade dos resultados. Sendo, talvez, possível melhores resultados com a utilização do sêmen de indivíduos isolados, cuja congelabilidade tenha sido previamente testada.

Os resultados deste experimento sugerem uma superioridade do diluidor à base de Tris em relação ao diluidor à base de água de coco na congelamento do sêmen do cão acrescidos de 20% de gema de ovo e 6% de glicerol, quanto aos parâmetros de vigor, alterações espermáticas totais e secundárias. Nos demais protocolos não se evidenciaram diferenças estatísticas significativas entre os dois diluidores, em nenhum dos parâmetros observados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, K. Fertility of frozen dog semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.13, p.128-134,1972.
- ANDERSEN, K. Insemination with frozen semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene*, v.10, n.1, p.1-4, 1975.
- BLUME, H., MARQUES JÚNIOR, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.18, n.3-4, p.97-104, 1994.
- CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., SILVA, L.D.M. Relação entre o espectrofotômetro e a câmara de Neubauer na determinação da concentração espermática do sêmen canino. In:

- ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UECE, 6, 1997, Fortaleza-Ce. **Anais...** Fortaleza, Ce : Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 1997. v.1. 472p. p.284.
- CHRISTIANSEN, I.J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1986. 363p.
- CONCANNON, P.W., BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. IN: KIRK. **Current veterinary therapy – Small animal practice, X**. Philadelphia : Saunders, 1989. p.1247-1289.
- CONCANNON, P.W., DIGREGORIO, G.B. Canine vaginal cytology. In: BURKE, T.J. **Small animal reproduction and infertility: A clinical approach to diagnosis and treatment**. Philadelphia : Lea & Febiger, 1986. Cap.2. p.96-111.
- DAVIES, P.R. **A study of spermatogenesis, rates of sperm production, and methods of preserving the semen of dogs**. Sydney, AUS, 1982. Thesis (PhD) - University of Sidney, 1982.
- DAVIS, J.S.; BRATTEN, R.W., FOOTE, R.H. Livability of bovine spermatozoa at +50°C, - 25°C and - 85°C in TRIS-buffered and citrate-buffered yolk-glicerol-extenders. **Journal of Dairy Science**, v.46, p.333-336, 1963.
- DOBRINSKY, I., LULA, I., BARTH, A.D., *et al.* Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.291-296, 1993.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog's semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.243-255, 1993.
- FARSTAD, W., ANDERSEN-BERG, K. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl.39, p.289-292, 1989.
- FOOTE, R.H. Extenders for freezing dog semen. **American Journal of Veterinary Research**, v.25, n.104, p.37-40, 1964.
- LEES, G.E., CASTLEBERRY, M.W. The use of frozen semen for artificial insemination of German Shepherd dogs. **J Am Anim Hosp Assoc**, v.13, p.382-386, 1977.
- LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl.39, p.299-310, 1989.
- MILITÃO, S.F., POSSO, C.S., SOUZA, F.M. Avaliação de diluidores alternativos para a inseminação artificial em capotes (*Numida meleagris*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Olinda, PE. **Anais...** Olinda, PE : Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. 656p. p.534.
- MONTEZUMA JÚNIOR, P.A., VIANA NETO, R., NUNES, J.F. Utilização da água de coco *in natura* com adição de gema de ovo como diluente de congelamento do sêmen canino, em *pailietes* de 0,5ml. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Olinda-Pe. **Anais...** Olinda, PE. Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. 656p. p.535.
- MORTON, D.B., BRUCE, S.G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl.39, p.311-316, 1989.
- NUNES, J.F., COBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor de sêmen dos mamíferos domésticos. **Ciência Animal**, v.5, n.1-2, p.15-21, 1995.
- NUNES, J.F., CIRÍACO, A. L. T., SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**. 2.ed. Fortaleza : Gráfica LCR, 1997. 199p.
- PLATZ, C.C., SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. **Lab Anim Sci**, v.27, n.6, p.1013-1016, 1977.
- RAVASZOVA, O., MESAROS, P., CINGAKOVA, V., *et al.* A study of the properties of dog ejaculate during long-term storage. **Folia Veterinaria**, v.40, p.95-99, 1996.
- RODRIGUES, A.P.R., TORRES, M.Z.G., OLIVEIRA, L.F., *et al.* Água de coco sob a forma estabilizada de gel e sua fração ativa adicionada ou não de gema de ovo como diluidores do sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Olinda-Pe. **Anais...** Olinda-PE : Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. 656p. p.540.
- RODRIGUES, B.R. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen canino criopreservado**. Porto Alegre, RS, 1997. 176p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.
- ROWSON, L.E.A. Infertility in cow, sow and bitch. **Irish Veterinary Journal**, v.8, n.10, p.216-227, 1954.
- SEAGER S.W.J. Artificial insemination in dogs. In: BURKE, T.J. **Small animal reproduction and infertility: A clinical approach to diagnosis and treatment**. Philadelphia : Lea & Febiger, 1986. Cap.3. p.207-217.
- SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. Efeito do processo de descongelamento sobre a viabilidade do sêmen canino *in vitro*. **Ciência Animal**, v.8, n.2, p.75-80, 1998.
- SILVA, L.D.M., VERSTEGEN, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v.44, p.571-579, 1995.
- SOUZA, J.A.T. **Estudo de algumas características do sêmen de cães da raça pastor alemão**. São Paulo-SP, 1985. 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1985.
- SOUZA, N.M., TEIXEIRA, M.D.A., OLIVEIRA, L.F. *et al.* Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel , como diluidores do sêmen ovino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Olinda-Pe. **Anais...** Olinda-PE : Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. 656p. p.583.
- TONIOLLI, R., MESQUITA, D.S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. **Rev Bras Reprod Anim**, v.14, p.249-254, 1990.