

ETILENO GLICOL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO

ETHYLENE GLYCOL ON CANINE SEMEN CRYOPRESERVATION

Marcio Pereira Soares¹ Carlos Augusto Rigon Rossi¹
Alceu Mezzalana² Marcelo Cecim³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização do etileno glicol, adicionado ao meio Tris-gema, na criopreservação de sêmen canino, considerando os seus efeitos sobre a motilidade, o vigor e a morfologia espermática pré e pós-congelamento. Como doadores, utilizaram-se quatro cães da raça Pastor Alemão coletados por manipulação digital os quais no ejaculado apresentaram padrões mínimos de 90% de motilidade, cinco de vigor espermático (0 - 5) e no máximo 35% de defeitos morfológicos totais. As concentrações de etileno glicol testadas foram de 0, 25; 0,5 e 1,0M, sendo empregados como controle 0,8M de glicerol. Foram feitas cinco avaliações de motilidade e vigor, respectivamente, na obtenção da fração rica, depois da primeira diluição, ao atingir 4°C, após uma hora de estabilização a 4°C e no descongelamento. Avaliou-se a morfologia espermática em sêmen a fresco e após o descongelamento das amostras de cada tratamento. Não houve diferença na motilidade e na morfologia espermática dos grupos após o descongelamento. No vigor espermático pós-descongelamento, as concentrações de 0,25 e 0,5M de etileno glicol foram semelhantes entre si e com a concentração de 0,8M de glicerol (controle), mas diferiram da concentração de 1M, a qual apresentou vigor inferior ao controle. Conclui-se que, para a criopreservação de sêmen canino, o glicerol 0,8M pode ser substituído pelo etileno glicol nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0M.

Palavras-chave: sêmen, cão, congelamento, etileno glicol.

SUMMARY

The objective of the present work was to evaluate the efficiency of ethylene glycol on cryopreservation of canine semen, considering its possible deleterious effects upon semen motility, vigor and morphology at the pre and post freezing stages, using a

tris-egg yolk extender. Four adult german shepards were used as donors. Samples were obtained by digital manipulation, and only ejaculates presenting a minimum of 90% motility and 5 (0-5) vigor and no more than 35% of total morphological defects were considered. Ethylene glycol concentrations tested were 0.25, 0.50 and 1.0M and 0.80M glycerol served as control. Motility and vigor were evaluated in the rich fraction, after first and second dilution, after 1 hour of stabilization at 4°C and after thawing. Sperm morphology was examined in the fresh sample and after thawing in each of the treatments. There were no detectable differences among the groups in sperm motility and morphology after thawing. There were no differences in vigor among the 0.25, 0.50M ethylene glycol and the 0.8M glycerol, but the 1M ethylene glycol had lower vigor scores after thawing. We conclude that ethylene glycol can be used as a cryoprotectant in the concentration of 0.25, 0.50 and 1.0M instead of glycerol.

Key Words: semen, dog, freeze, ethylene glycol.

INTRODUÇÃO

Desde o início, as biotécnicas de reprodução assistida foram direcionadas para espécies de interesse econômico, sendo que espécies de pequeno porte só adquiriram maior expressão com o crescimento da relação sentimental entre homem e animal. A possibilidade de intercâmbio de material genético e a preservação de gametas dessas espécies de valor sentimental, como os cães de companhia, bem como de outros economicamente

¹Médico Veterinário, Aluno do Programa de Pós-graduação (Mestrado) em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

²Professor do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade Estadual de Santa Catarina, Lages, SC.

³Professor Adjunto, PhD., Departamento de Clínica de Grandes Animais, Centro de Ciências Rurais, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS. E-mail: mcecim@lince.hev.ufsm.br. Autor para correspondência.

importantes, como a Raposa Azul (*Alopes lagopus*) e a Raposa Prateada (*Vulpes vulpes*), portadores de genes mutantes de alto valor comercial para a indústria de curtume européia, com a preservação de animais da fauna brasileira em risco de extinção, como o Lobo Guará Brasileiro (*Chrysocyon brachyurus*) e a Raposinha do Campo (*Pseudalopex sp.*), têm suscitado a necessidade de estabelecimento de um eficiente protocolo para a criopreservação de sêmen canino (FARSTAD, 1996).

O primeiro congelamento de sêmen canino foi notificado em 1954 por Rowson e, no ano de 1969, Seager obteve a primeira prenhez com sêmen criopreservado. Desde então, diversas pesquisas foram empreendidas, a fim de se determinarem métodos de preservação de espermatozoides caninos por congelamento (ENGLAND & PONZIO, 1996). Atualmente, as taxas de concepção, utilizando-se sêmen congelado, oscilam entre 67 e 80%, as quais são obtidas através da deposição intra-uterina, com uma concentração de 50 a 150 milhões de espermatozoides, por inseminação, sendo empregadas duas inseminações, com um intervalo de 24 horas (FARSTAD, 2000).

Os diluidores utilizados para o resfriamento e congelamento de espermatozoides de cães foram adaptados de outras espécies (FASTARD, 1996), sendo inicialmente empregados meios à base de leite desnatado, lactose-gema, citrato-gema, tris-gema, entre outros. Atualmente, a maioria dos pesquisadores que trabalham com criopreservação de sêmen canino empregam diluidores à base de Tris e/ou citrato de sódio, com um açúcar como frutose, glicose ou lactose mais gema de ovo, associado ao crioprotetor glicerol em diferentes concentrações (RODRIGUES & RODRIGUES, 1998).

O glicerol é o crioprotetor mais usado no congelamento de sêmen nas espécies domésticas (FARSTAD, 1996). Entretanto, seus efeitos deletérios sobre os espermatozoides são relatados por McLAUGHLIN *et al.* (1992), e ocorrem, provavelmente, pelas alterações causadas na sua membrana plasmática do espermatozoide (HAMMERSTEDT & GRAHAN, 1992).

Com a evolução da biotecnologia, outros crioprotetores foram estudados. Dentre os menos tóxicos, encontra-se o etileno glicol. PLATOV (1965), congelando sêmen ovino, obteve resultados semelhantes no congelamento com 0,47M de glicerol e etileno glicol nas concentrações de 0,27 e 0,36M, observando, porém, efeito negativo com a

concentração de 0,89M de etileno glicol. SALAMON & MAXWELL (1995), ao congelarem sêmen ovino em pellets, determinaram que o etileno glicol foi superior ao glicerol nas concentrações de 0,31 e 0,63M, sendo que os melhores resultados foram obtidos com 0,27M de etileno glicol. MORAES *et al.* (1998), quando congelaram sêmen ovino em pellets, concluíram que 0,5M de etileno glicol proporcionou motilidade e vigor semelhantes a 0,72M de glicerol, porém com uma melhor proteção acrossomática. MERCANTE *et al.* (1995) compararam a eficiência dos dois crioprotetores em sêmen equino, verificando uma melhor performance do etileno glicol tanto com relação à motilidade e ao vigor quanto no teste de termo-resistência. NEVES NETO *et al.* (1995), comparando o glicerol ao etileno glicol, obtiveram maiores índices de prenhez com sêmen equino congelado com etileno glicol. Já ALVARENGA *et al.* (2000) não observaram diferenças entre o glicerol e etileno glicol na criopreservação de sêmen equino.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade crioprotetora do etileno glicol em diluente Tris-gema na manutenção da motilidade, do vigor e da morfologia espermática do sêmen canino.

MATERIAL E MÉTODO

Como doadores de sêmen, utilizaram-se quatro cães da raça Pastor Alemão, com idade média de 3,6 anos, pertencentes ao Canil Vento Divino da Base Aérea de Santa Maria (BASM). Todos os animais foram submetidos ao mesmo manejo sanitário e alimentar, recebendo ração comercial uma vez ao dia e água ad libitum. As coletas de sêmen foram realizadas através da técnica de manipulação digital, com observação das três fases da ejaculação e seleção da segunda fração, rica em espermatozoides (CHRISTIANSEN, 1986). Foram realizadas duas coletas em média por semana, entre os meses de outubro e novembro. Após a coleta, os ejaculados foram mantidos a 27°C em banho-maria durante a sua avaliação. Foram utilizados para congelação somente os ejaculados com padrões mínimos de 90% de motilidade progressiva, vigor espermático 5 na escala de PLATZ & SEAGER (1977) e com, no máximo, 35% de defeitos morfológicos totais. Para a determinação das concentrações espermáticas utilizou-se ($\times 10^6/\text{mm}^3$) câmara hematimétrica, diluição 1:100 em solução de formol-citrato a 4%, microscopia ótica, com objetiva de aumento de 400X (FELDMAN & NELSON,

1996). As alterações morfológicas foram classificadas em primárias e secundárias (SEAGER, 1986).

O diluidor usado foi o Tris-gema, composto por 3,028g de Tris (trimethylhydroxyaminomethane) (acrescido de 1,75g de ácido cítrico monohidrato, 1,25g de D-frutose diluídos em 100ml (qsp) de água destilada (RODRIGUES & RODRIGUES, 1998) e 20% de gema de ovo (diluidor I). A partir do diluidor I, constituiu-se o diluidor II pela adição dos crioprotetores de acordo com os tratamentos, sendo testadas as concentrações de 0,25; 0,5 e 1M de etileno glicol^a e 0,8M de glicerol^a (controle).

Os ejaculados considerados aptos foram diluídos inicialmente pela adição do diluidor I a 27°C na proporção de duas partes de diluente para uma parte do ejaculado, seguindo-se da segunda avaliação da motilidade e vigor espermático e do início do resfriamento em água com gelo. Ao atingir a temperatura de 4,0°C, efetuou-se a segunda diluição, adicionando-se o diluidor II isotérmico, na mesma proporção do diluidor I, seguida da terceira avaliação da motilidade e do vigor espermático. Após essas avaliações, as amostras foram submetidas à estabilização em 4,0°C durante o período de uma hora. Concluída a estabilização, procede-se uma quarta avaliação da motilidade e do vigor espermático antes do envase (E) de cinco palhetas de 0,5mL, previamente identificadas de acordo com o respectivo tratamento de cada repetição. Essas palhetas foram seladas com álcool polivinílico e depositadas sobre um suporte flutuante, o que permitiu sua exposição horizontal ao vapor de nitrogênio líquido (N₂) a uma altura de 3,5cm durante 20 minutos. Após esse período, as palhetas foram depositadas diretamente no N₂, onde foram acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico a -196oC. O processo de descongelamento foi realizado em banho-maria a 37°C (SILVA *et al.*, 1998), seguido da quinta avaliação da motilidade e do vigor espermático e das alterações morfológicas, executada em preparação úmida sob microscopia de contraste de fase (objetiva 100X), tendo sido contadas 200 células por amostra. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com quatro repetições, sendo o animal o critério de bloqueamento. As análises estatísticas

incluíram a análise de variância e o “Teste F”. Diferenças significativas a 5% ensejaram a aplicação do “Teste de Tukey” para a classificação das médias no mesmo nível de significância. As variáveis motilidade no sêmen fresco, após a adição do diluidor I e do diluidor II, antes do envase e após o descongelamento, bem como vigor, após o descongelamento foram analisadas depois de sofrerem a transformação Raiz Quadrada. Os defeitos morfológicos primários, secundários e totais no sêmen fresco e os defeitos morfológicos primários no sêmen descongelado também passaram pelo mesmo processo de transformação. Organizaram-se os dados referentes à morfologia espermática num esquema fatorial 4 x 2 (4 substâncias testadas x morfologia espermática do sêmen fresco e descongelado). Para a análise dos dados, empregou-se o pacote estatístico SAS (SAS, 1988).

RESULTADOS

As características da fração espermática dos ejaculados são apresentados na tabela 1. Dentro dos parâmetros considerados normais para a espécie, citados por BURKE (1986) os valores encontrados são excelentes para a raça utilizada no experimento. Na tabela 2, são apresentados os defeitos morfológicos no sêmen descongelado, sendo avaliados conforme citado por BURKE (1986). O acompanhamento da motilidade e do vigor espermático, durante todas as etapas do processo de congelamento, permitiu avaliar a influência dos crioprotetores etileno glicol nas concentrações de 0,25, 0,50 e 1 M, e do glicerol 0,8 M (controle).

Na figura 1, são demonstrados os resultados de motilidade nas diferentes fases do processo de

Tabela 1 - Características das frações espermáticas de quatro cães da raça Pastor Alemão utilizados no experimento, representados por valores mínimos, média ± erro padrão da média (EPM) e valores máximos (n= 10 ejaculados).

<i>Parâmetros Avaliados</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Média</i>	<i>Máximo</i>
Volume da 2ª fração (ml)	0,5	1,05 ± 0,12	2,0
Concentração espermática (x 10 ⁶ /mm ³)	0,34	0,58 ± 0,07	1,05
Número total de espermatozóides (x 10 ⁶ /ml)	262,50	597,25 ± 79,72	1050
Motilidade (%)	90	93,75 ± 0,63	95
Vigor (0-5)	5	5,00 ± 0,00	5
Defeitos morfológicos primários (%)	5	10,87 ± 0,24	18
Defeitos morfológicos secundários (%)	4	10,93 ± 0,26	24
Defeitos morfológicos totais (%)	6	21,80 ± 0,30	35

Tabela 2 - Valores médios de alterações morfológicas espermáticas no sêmen canino pós descongelamento. (média \pm erro padrão da média).

Crioprotetores	Defeitos morfológicos primários (%)	Defeitos morfológicos secundários (%)	Defeitos morfológicos totais (%)
*EG(0,25 M)	5,00 \pm 0,81 ^a	18,75 \pm 2,86 ^{ab}	23,75 \pm 3,19 ^a
*EG(0,50 M)	6,25 \pm 1,79 ^a	19,75 \pm 2,17 ^{ab}	26,00 \pm 3,87 ^a
*EG(1 M)	4,50 \pm 2,02 ^a	13,50 \pm 3,27 ^b	18,00 \pm 5,21 ^a
*GL	8,00 \pm 3,24 ^a	26,00 \pm 4,06 ^a	34,00 \pm 7,14 ^a

^{abc} Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, são significativamente diferentes entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

*EG (Etileno glicol), GL (glicerol).

congelamento. Não foram observadas diferenças estatísticas quanto à motilidade no sêmen fresco, após a adição do diluidor I e do diluidor II. Ao envase, as concentrações de 0,25 e 0,50M de etileno glicol e de 0,8M de glicerol não apresentaram diferenças quanto à motilidade quando comparadas entre si, em todas as etapas, no entanto, 0,25 e 0,50M de etileno glicol tiveram maior concentração de 1M, a qual apresentou resultados semelhantes ao glicerol. No descongelamento, não se observaram diferenças entre os grupos etileno glicol e glicerol quando comparados entre si.

O vigor espermático do sêmen, demonstrado ao longo do processo de congelamento e visualizado na figura 2, demonstrou não haver diferenças entre os grupos no sêmen a fresco e na adição do diluidor I. Após a adição do diluidor II, não houve diferenças entre as concentrações de 0,25, 0,50M de etileno glicol, sendo que as mesmas foram semelhantes ao controle (0,8M de glicerol), mas diferiram da concentração de 1M, a qual se mostrou semelhante ao controle.

Ao envase, o vigor nos grupos 0,25 e 0,50M de etileno glicol, foi similar. No entanto, ambos os grupos foram superiores ao vigor dos grupos 0,8M de glicerol e 1M de etileno glicol. Após o descongelamento, as diferenças encontradas entre os grupos no vigor espermático, foram semelhantes às acima descritas, não apresentando diferenças entre si, mas se mostrando superiores às concentrações de 0,8M de glicerol e 1M de etileno glicol.

A avaliação dos defeitos morfológicos totais no pós-descongelamento demonstrou não haver diferenças entre as diferentes concentrações de etileno glicol testadas quando comparadas entre si e com o crioprotetor controle (glicerol).

DISCUSSÃO

Os valores observados nas tabela 1 demonstram que os ejaculados se encontravam

dentro dos padrões fisiológicos da espécie, segundo CHRISTHIANSEN (1986) e, portanto, estavam aptos a serem utilizados no experimento. A avaliação da motilidade do sêmen antes do envase, demonstrado na figura 1, demonstrou a ocorrência de uma menor motilidade espermática na concentração de 1M de etileno glicol. Tal fato ratifica os resultados obtidos por RODRIGUES & RODRIGUES (1998), os quais observaram que ao

adicionarem o crioprotetor glicerol ao sêmen canino pré-diluído ocorria uma diminuição acentuada da motilidade progressiva dos espermatozoides. Apesar da diferença observada entre os tratamentos na avaliação espermática antes do envase, essa variação não ficou evidenciada nos tratamentos após o descongelamento. Resultados semelhantes foram obtidos por MORAES *et al.* (1998) que, congelando sêmen ovino com 0,50M de etileno glicol, notaram uma manutenção da motilidade semelhante a do glicerol (0,72M), e por ALVARENGA *et al.* (2000) que, ao congelarem sêmen eqüino, não observaram diferenças entre a utilização de glicerol e etileno glicol.

A inexistência de variações no vigor espermático (Figura 2) no sêmen fresco deve-se à qualidade dos ejaculados usados no experimento. No entanto, a manutenção desse vigor, após a adição do diluidor I, ocorreu em razão do fornecimento de um substrato energético para os espermatozoides. Após a adição do diluidor II, houve um decréscimo significativo no vigor espermático das concentrações de 0,8M de glicerol e 1M de etileno glicol. Isso pode ter ocorrido em função da alteração da osmolaridade (FARSTAD, 1996), e da ação do agente crioprotetor sobre os espermatozoides, bem como do seu efeito tóxico relatado por MORAES *et al.* (1998) que observaram um pior desempenho do etileno glicol na concentração de 0,7M. McLAUGHLIN *et al.* (1992) descreve os efeitos tóxicos do glicerol sobre os espermatozoides, fato que ocorre provavelmente em função da interação molecular do glicerol com a membrana plasmática dos espermatozoides, alterando sua fluidez pela intercalação na dupla camada lipídica, o que modifica a viscosidade citoplasmática e, dessa maneira, afeta todas as reações metabólicas (HAMMERSTEDT & GRAHAN, 1992).

A avaliação dos defeitos morfológicos totais no sêmen descongelado entre as concentrações testadas demonstrou haver semelhanças entre os

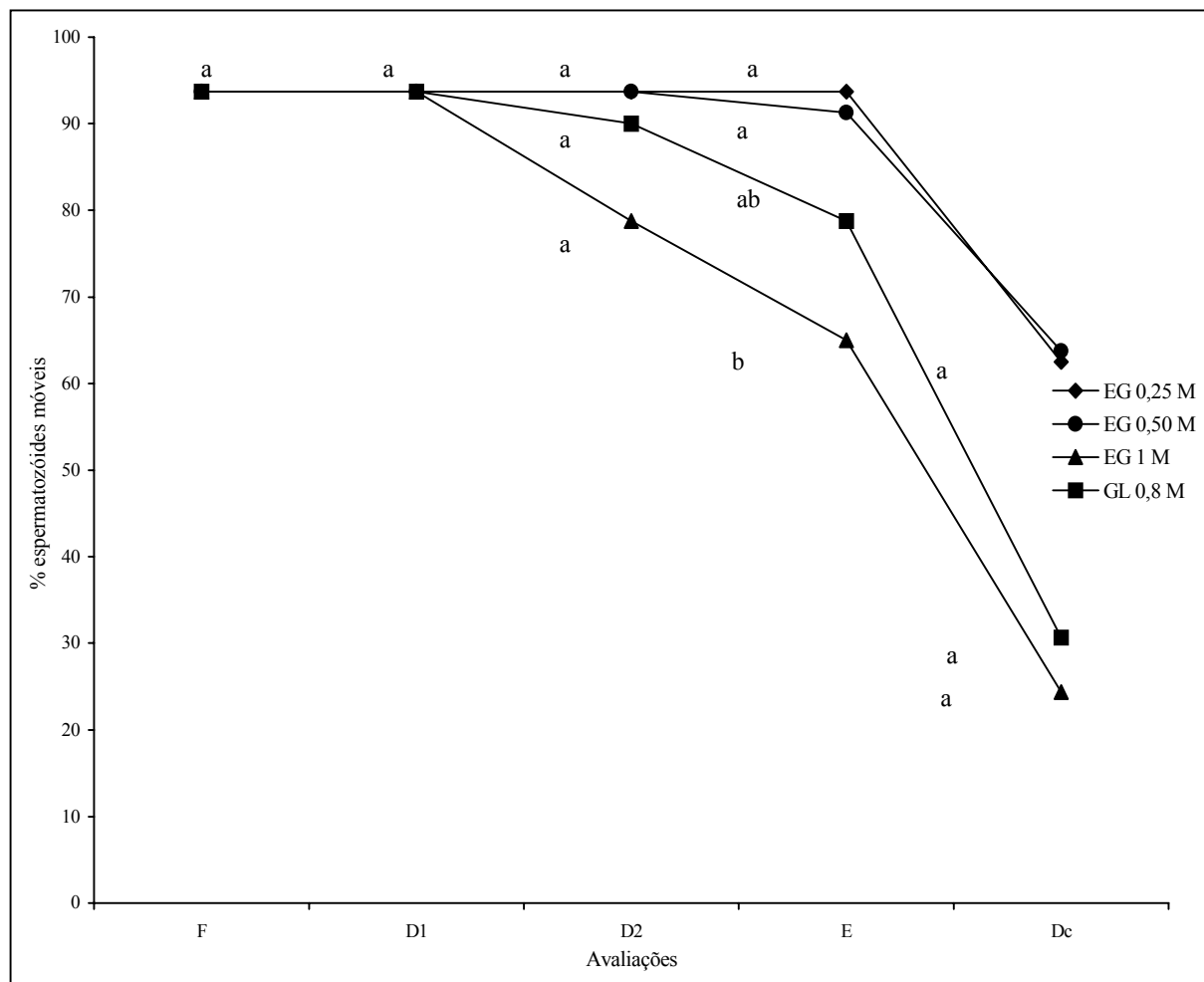


Figura 1 – Porcentagem de espermatozoides móveis no sêmen canino fresco (F) após a primeira diluição (D1), segunda diluição (D2), no momento do envase (E) e no descongelamento (Dc), empregado diferentes concentrações de etileno glicol (EG) e glicerol (GL) como crioprotetor.

^{a,b} Letras diferentes na mesma avaliação implicam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey (P<0,05).

tratamentos testados. Resultados semelhantes foram obtidos por PEÑA *et al.* (1998), avaliando os danos acrossomais de espermatozoides congelados com glicerol pela técnica de coloração nigrosina-eosina. Os autores observaram manutenção de elevadas porcentagens de espermatozoides com acrossoma intacto. Entretanto, RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.* (1993) observaram que, apesar de uma aparente manutenção da morfologia acrossomal, na microscopia eletrônica de transmissão foram verificadas perdas de conteúdo e vesiculação das membranas acrossomais após o descongelamento. Esse fato pode justificar a baixa porcentagem de anormalidades acrossomais, usualmente relatadas quando usada microscopia de contraste de fase. Somente uma análise por microscopia eletrônica, ou com sondas fluorescentes ou corantes como a

clortetraciclina possibilitaria uma observação mais detalhada dos espermatozoides criopreservados pelas concentrações testadas, o que definiria qual a melhor concentração a ser empregada.

CONCLUSÕES

O etileno glicol nas concentrações de 0,25, 0,50 e 1M. é um crioprotetor que pode substituir o glicerol em diluentes à base do tris-gema.

AGRADECIMENTOS

Ao Canil Vento Divino da Base Aérea de Santa Maria (BASM) pela cedência dos animais.

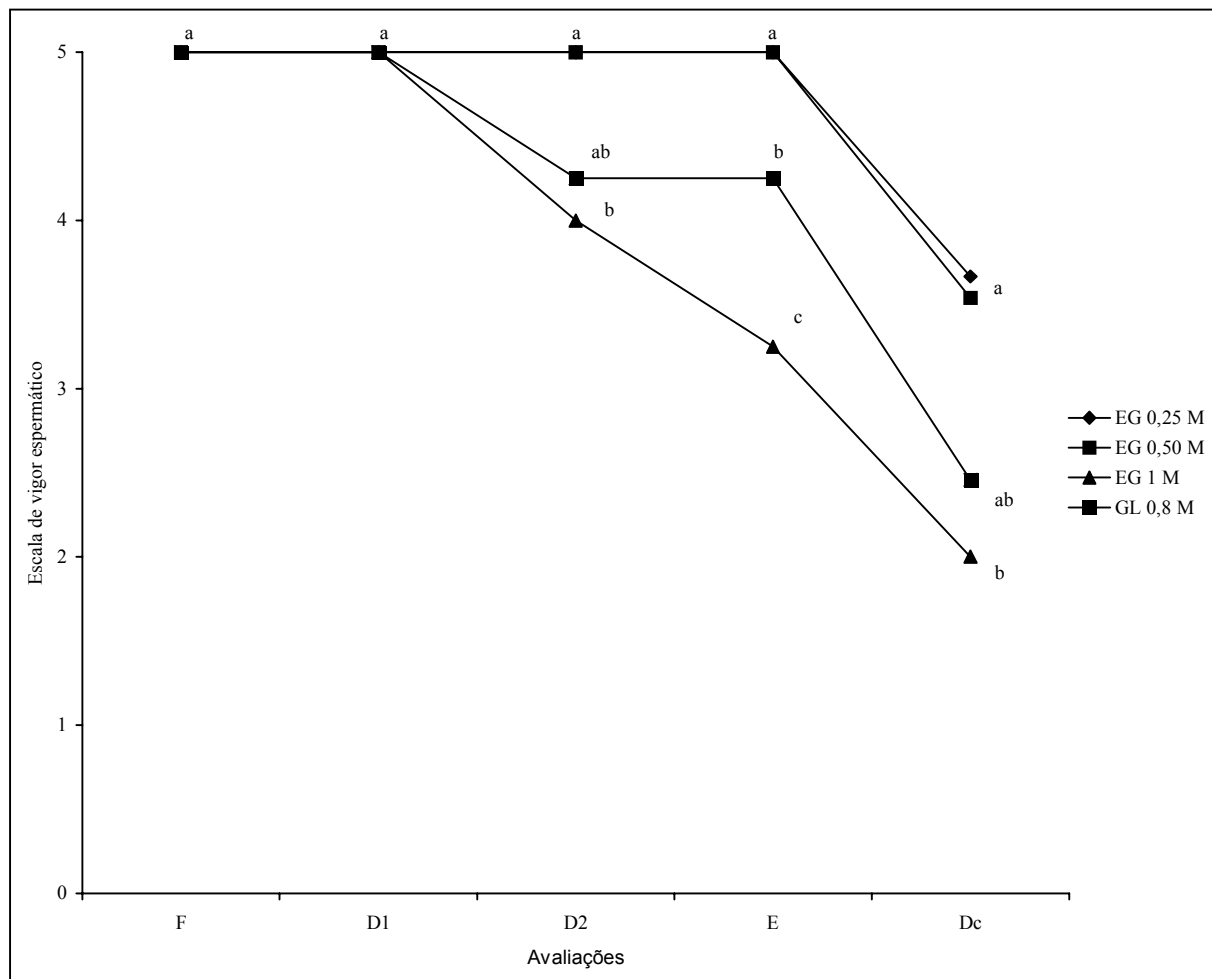


Figura 2 - Vigor espermático no sêmen canino fresco (F) após a primeira diluição (D1), segunda diluição (D2), no momento do envase (E) e no descongelamento (Dc), empregando diferentes concentrações de etileno glicol (EG) e glicerol (GL) como crioprotetor.
^{a,b,c} Letras diferentes na mesma avaliação implicam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey (P<0,05).

FONTES DE AQUISIÇÃO

^a Sigma Chemical Company. St. Louis. Mo. USA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, M.A., LANDIM-ALVARENGA, F.C., MOREIRA, R.M., *et al.* Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, v.32, n.6, p.541-545, nov, 2000.
- BURKE, T.J. **Small animal reproduction and infertility**. A clinical approach to diagnosis and treatment. Philadelphia : Lea & Febiger, 1986. p.210-211.
- CHRISTIANSEN, I.J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo : Manole, 1986. 363p.
- ENGLAND, G.C. W., PONZIO, P. Comparasion of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v.46, p.165-171, 1996.
- FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.251-260, 1996.
- FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, v.53, p.175-186, 2000.
- FELDMAN, E.D, NELSON, R.C. Clinical and diagnostic evaluation of male reproductive tract. In: FELDMAN, E.D; NELSON, R.C. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia : Saunders, 1996. p.673-690.
- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAN, J.K. Cryopreservation of mammalian sperm: the enigma of glicerol. **Cryobiology**, v.29, p.26-38, 1992.
- McLAUGHLIN, E.A., FORD, W.C.L., HULL, M.G.R. The contribution of the toxyty of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.749-754, 1992.

- MERCANTE, C.F.J., ARRUDA, R.P., NEVES NETO, J.R., *et al.* Congelação de sêmen equino em etileno glicol ou glicerol: motilidade, vigor e teste de termoressistência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1995. **Anais...** Belo Horizonte, MG : Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.290.
- MORAES, C.N., NEVES, J.P., GONÇALVES, P.B.D., *et al.* Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etileno glicol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.2, p.287-292, 1998.
- NEVES NETO, J.R., MERCANTE, C.F.J., ARRUDA, R.P., *et al.* Fertilidade do sêmen equino congelado com etilenoglicol ou glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1995, Belo Horizonte - MG. **Anais...** Minas Gerais : Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.292.
- PEÑA, A.I., BARRIO, F., QUINTELA, L.A., *et al.* Effect of different glycerol treatment on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v.50, p.163-174, 1998.
- PLATOV, E.M. The freezing of ram semen in a lactose-yolk ethilenglycol diluent. **Animal Breeding Abstract**, p.76-77, 1965.
- PLATZ, C.C., SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. **Laboratory Animal Science**, v.27, n.6, p.1013-1016, 1977.
- RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Efeito da adição de diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) ao diluidor à base de tris sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen canino criopreservado. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.26, n.2, p.32-49, 1998.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., EKWALL, H., LINDEFORSBERG, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.47 (Suppl.), p.279-285, 1993.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185-249, 1995.
- SAS. **Statistical Analysis System**, 6.03ed. Cary, NC, USA : SAS Institute INC, 1988. 1028p.
- 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.