

REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN DE CÃES COM PROSTATOMEGALIA

(Sperm cooling of dogs with prostatomegaly)

Breno Queiroz PINHEIRO¹; Annice AQUINO-CORTEZ¹; Francisco Felipe de MAGALHÃES¹; Herlon Rodrigues SILVA¹; David Baruc Cruvinel LIMA¹; Lúcia Daniel Machado da SILVA¹

¹Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Avenida Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, CEP 60714-903, Fortaleza, CE; E-mail: lucia.daniel.machado@hotmail.com

RESUMO

A prostatomegalia é uma das prostatopatias mais comuns em cães não-castrados; contudo, estudos que descrevam a resfriamento do sêmen desses animais são inexistentes. O presente trabalho objetivou refrigerar o sêmen de cães com prostatomegalia. Foram utilizados 4 cães (2 Rottweiler, 1 Pastor Alemão e 1 Retriever Labrador) diagnosticados com prostatomegalia, por meio de palpação retal, exame ultrassonográfico e hemospermia. Realizaram-se duas coletas de sêmen de cada animal (n = 8), por meio de manipulação digital, sendo realizada avaliação, por meio de microscopia óptica para os parâmetros de concentração espermática, motilidade (%), vigor (0-5), espermatozoides morfológicamente normais (%), viáveis (%) e com membrana funcional (%). Após a avaliação do sêmen fresco (SF), o mesmo foi diluído com TRIS, adicionado de 20% de gema de ovo e 6% glicerol, atingindo a concentração de 50×10^6 sptz/mL. O sêmen foi novamente avaliado após a diluição (AD), acondicionado em caixa térmica (4 °C/40min), transferido para um refrigerador (4 °C) e reavaliado às 2h, 4h e 6h. A motilidade e o vigor do SF foram superiores aos demais tempos avaliados, mas se mantiveram estáveis e não diferiram de AD até as 6h de refrigeração. A viabilidade não diferiu entre o SF e AD, mas foi reduzida aproximadamente 52,5%, durante a refrigeração. A percentagem de espermatozoides com membrana funcional e com morfologia normal não diferiu entre os tempos analisados. Como os parâmetros espermáticos durante a refrigeração são inferiores aos recomendados para a espécie (>30% e 3, respectivamente), conclui-se que o sêmen resfriado de cães com prostatomegalia é inviável e insatisfatório para programas de reprodução assistida.

Palavras-chave: Criopreservação, Sêmen, Prostatomegalia, Cão.

*Endereço para correspondência:
lucia.daniel.machado@hotmail.com

ABSTRACT

A prostatomegaly is one of the most common prostate disease in non-castrated dogs. Studies that describe cooled semen of these animals do not exist. So, the present work aimed to cool the semen of dogs with prostatomegaly. Four dogs (2 Rottweiler, 1 German Shepherd and 1 Labrador Retriever) were diagnosed with prostatomegaly by rectal palpation, ultrasound examination and hemospermia. Two semen samples were collected from each animal (n = 8) by digital manipulation, using optical microscopy for sperm concentration, motility (%), vigor (0-5), morphologically normal spermatozoa (%), viable (%) and functional membrane (%). After fresh semen (FS) evaluation, the semen was diluted with TRIS added with 20% egg yolk and 6% glycerol, producing a concentration of 50×10^6 spz/mL. (4 °C/40min) (after dilution - AD), transferred to a refrigerator (4 °C) and reassessed at 2h, 4h and 6h. A motility and vigor of FS were the most advanced, but remained and did not differ from AD up to 6h refrigeration. Viability did not differ between FS and AD but reduced approximately 52.5% during refrigeration. The percentage of spermatozoa with functional membrane and normal morphology did not differ between the times analyzed. As the parameters expected during refrigeration are inferior to those recommended for a species (<30% and 3, respectively), it is concluded that semen of dogs with prostatomegaly are invalid and unsatisfactory for assisted reproduction programs.

Keywords: Cryopreservation, Semen, Prostatomegaly, Dog.

INTRODUÇÃO

Um aumento crescente no número de criadores comerciais de cães, atrelado a uma maior necessidade de conhecimentos sobre fisiologia reprodutiva desta espécie estimularam cada vez mais pesquisas sobre as biotecnologias de sêmen (SILVA e GADELLA, 2006; CHIRINÉA *et al.*, 2013). Dentre as técnicas mais largamente estudadas citam-se a preservação de sêmen de cães por meio da refrigeração e congelamento (ALCANTAR-RODRIGUEZ e MEDRANO, 2017).

O objetivo dessas técnicas é diminuir o metabolismo dos espermatozoides, durante sua conservação,

prolongando a sua vida útil (ENGLAND e PONZIO, 1996). A redução do metabolismo das células espermáticas restringiu perdas de energia e diminuiu a formação de metabólitos tóxicos no armazenamento e transporte do sêmen (HOLT, 2000). A refrigeração foi uma boa técnica para a conservação do sêmen, por possibilitar o seu transporte por distâncias mais próximas, em curto tempo (ALMEIDA, 1998). Trabalhos já demonstraram que as taxas de concepção por Inseminação Artificial (IA) com sêmen refrigerado foram semelhantes à monta natural (LINDE-FORSBERG, 1991; UCHOA *et al.*, 2012).

Para o sucesso desta biotecnologia, fez-se necessário o uso de diluidores, adicionados de crioprotetores. Um bom diluente, além de diluir o sêmen, deve ser isotônico (pH e osmolaridade compatíveis com o plasma seminal), ser de baixa toxicidade e deve favorecer condições adequadas para a sobrevivência espermática (FARTAGLIONE e RITTA, 2004), com a função de proporcionar condições osmóticas favoráveis, bem como energia aos espermatozoides, durante todo o período de armazenamento (OLIVEIRA, 2003; PAYAN-CARREIRA *et al.*, 2011). O TRIS-gema-glicerol, o Leite-gema, a Nata-gema e a água de coco em pó (ACP) foram os diluentes mais utilizados na espécie canina (EBGLAND e PONZIO, 1996; SILVA *et al.*, 1996, UCHOA *et al.*, 2012).

A próstata é a única glândula acessória sexual do cão e o seu fluido, o líquido prostático (LP), constituiu 95% do seu plasma seminal tendo como principal função o transporte espermático para o útero (IGUER-OUADA e VERSTEGEN, 2001; ENGLAND *et al.*, 2012). Patologias na glândula prostática puderam ocasionar importantes alterações no LP, provocando alterações nas concentrações dos seus constituintes bioquímicos e, conseqüentemente, interferirem na qualidade reprodutiva dos animais acometidos (AQUINO-CORTEZ *et al.*,

2014). Mais de 80 % dos cães com mais de 5 anos de idade apresentaram patologias na próstata (JOHNSON *et al.*, 2000), sendo a hiperplasia prostática benigna (HPB) a alteração mais comum (SAGOLS e NAVARO, 2013).

Devido à inexistência de estudos utilizando cães portadores de alterações prostáticas em programas de inseminação e aos efeitos desconhecidos desse processo patológico na qualidade seminal no sêmen resfriado, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros seminais de cães com prostatomegalia, durante o processo de refrigeração.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual do Ceará, sob o número 2334084-15.

Foram utilizados 2 cães das raças Rottweiler, 1 Pastor Alemão e 1 Retriever Labrador, com pesos entre 33 e 45 Kg, e idades variando de 6 a 11 anos, pertencentes à 4ª Companhia de Choque/CPCÃES da Polícia Militar do Estado do Ceará (PMCE), localizada na cidade de Fortaleza. Os cães foram mantidos em canis individuais e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Os cães foram submetidos a exame clínico geral, tiveram o sangue coletado por venopunção, para hemograma completo e bioquímica sérica (creatinina e alanina aminotransferase), sendo submetidos a palpação retal e ultrassonografia transabdominal (SonoAce Pico – Medison - Sonda Multifrequencial Linear de 5 - 9 MHz) da próstata. Somente os animais que se apresentaram sem alterações nos exames clínicos e hematológicos foram utilizados nesse experimento. Por meio da ultrassonografia abdominal, o volume prostático foi estimado, a partir da maior medida craneocaudal (L), diâmetro transversal (W) e diâmetro dorsoventral (D), e aplicada à fórmula: o volume em $\text{cm}^3 = ([L \times W \times D] / 2,6) + 1,8$ (KAMOLPATANA *et al.*, 1999). Os cães que apresentaram volume prostático maior do que $28,2 \text{ cm}^3$ e hemospermia foram considerados com prostatomegalia (AT'ALAN *et al.*, 1999) e foram utilizados.

Coleta e avaliação do sêmen

Foram realizadas duas coletas de sêmen de cada cão, totalizando 8 coletas, utilizando-se a técnica de manipulação digital do bulbo peniano (CHRISTIANSEN, 1988), sempre na presença de fêmea. Imediatamente após a coleta, 10 μL da segunda fração do ejaculado (rica em espermatozoides) foram

submetidas à microscopia óptica (100x) para avaliação da motilidade (%) e vigor espermáticos (escala de 0 a 5). Para análise da percentagem de espermatozoides viáveis, 10 μL de sêmen foram dispostos em uma lâmina de vidro, juntamente com 10 μL da coloração vital Azul de Bromofenol, foi confeccionado um esfregaço e os espermatozoides considerados mortos, quando corados com o reagente (400x).

Uma alíquota de 10 μL de sêmen foi diluída em 150 μL de coloração Rosa Bengala para a avaliação da percentagem de espermatozoides com alterações morfológicas (1000x) (CHRISTIANSEN, 1988). Para o teste de funcionalidade de membrana, 10 μL de sêmen foram adicionados a 90 μL de água destilada e mantidos à temperatura ambiente, até sua avaliação (400x – QUINTELA *et al.*, 2010). Uma alíquota de 5 μL de sêmen foi diluída em 1 mL de solução salina formolizada 1%, para determinação da concentração espermática por câmara de Newbauer (1000x).

Diluição e refrigeração do sêmen

Logo após a coleta, as amostras de sêmen de cada animal foram diluídas com TRIS (3.028g tris-hidroximetilamonometano, 1.78g ácido cítrico monohidratado e 1.25g D-frutose, diluídos em 100 mL de água destilada), acrescidas

de 20% de gema de ovo e 6% de glicerol, para que se obtivesse uma concentração fixa de 50×10^6 spz/mL (temperatura ambiente média de 28 °C).

As aliquotas de sêmen diluídas foram mantidas em tubos de vidro de 3 mL, e acondicionados em caixa térmica de 5L (15,5 x 21,5 x 16,5cm), contendo uma unidade de gelo reciclável, resfriada previamente (1L, Gelo Eutético®, Campinas, Brasil). As amostras foram mantidas na caixa à temperatura de 15 °C, por aproximadamente 40 minutos (tempo do trajeto até o laboratório), de onde foram então transferidas para um refrigerador e mantidas à temperatura de 4 °C, por um período total de 6h. As temperaturas internas da caixa térmica e do refrigerador foram mensuradas através de termômetro digital (J PROLAB®, São José dos Pinhais, Brasil).

As análises dos parâmetros espermáticos descritos anteriormente foram realizadas imediatamente após a coleta no sêmen fresco (SF), após diluição (AD) e às 2h, 4h e 6h de refrigeração a 4 °C. Para as avaliações dos parâmetros espermáticos, aliquotas de 250 µL foram reaquecidas em banho-maria à temperatura de 37 °C, durante aproximadamente 1 min.

Análise estatística

Para análise estatística, os resultados foram expressos de forma

descritiva (média \pm desvio-padrão). Dados expressos em percentuais foram previamente transformados em arcoseno. Em seguida, todos os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, para comparação entre os tempos de refrigeração, exceto para o vigor. Os dados referentes ao vigor espermático foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todos os animais apresentaram resultados normais no hemograma e na bioquímica sérica (creatinina e alanina aminotransferase). No exame ultrassonográfico, observou-se que todos os animais apresentaram prostatomegalia (Tab. 1).

O SF apresentou motilidade espermática média (%) de $92,5 \pm 13,9$; vigor de $4,8 \pm 0,5$; concentração média de $276 \pm 124 \times 10^6$ spz/mL; $79,4 \pm 14,8$ de espermatozoides viáveis (%); $84,6 \pm 15,2$ de espermatozoides com membrana funcional (%) e $76,1 \pm 10,5$ de espermatozoides com morfologia normal (%).

Durante o processo de refrigeração, houve declínio significativo em todos os tempos para os parâmetros de motilidade e vigor, quando comparados com o SF (Tab. 2) (Fig. 1). Já em relação à percentagem de

espermatozoides morfológicamente normais e com funcionalidade de membrana, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os diferentes tempos. Após a diluição, a porcentagem de

espermatozoides vivos não apresentou diferenças significativas com o SF e com os demais tempos; já nos tempos 2h, 4h e 6h diferiram significativamente do SF.

Tabela 1: Avaliação dos parâmetros ultrassonográficos (média ± DP) da próstata de cães com prostatomegalia.

Parâmetros	Referência (cm)	Medidas realizadas (cm)
Maior medida craniocaudal (L)	3,15±0,83	3,89±0,43
Diâmetro transversal (W)	3,15±0,9	3,54±0,57
Diâmetro dorsoventral (D)	2,83±0,60	4,64±0,84
Volume prostático	16,77±11,77	27,02±8,95 cm ³

Fonte: Adaptado de Kamolpatana *et al.*, 1999.

Tabela 2: Avaliação dos parâmetros espermáticos (média ± DP) do sêmen fresco (SF) e diluído com TRIS-gema-glicerol, de cães portadores de prostatomegalia, durante o processo de refrigeração (2h, 4h e 6h) a 4 °C.

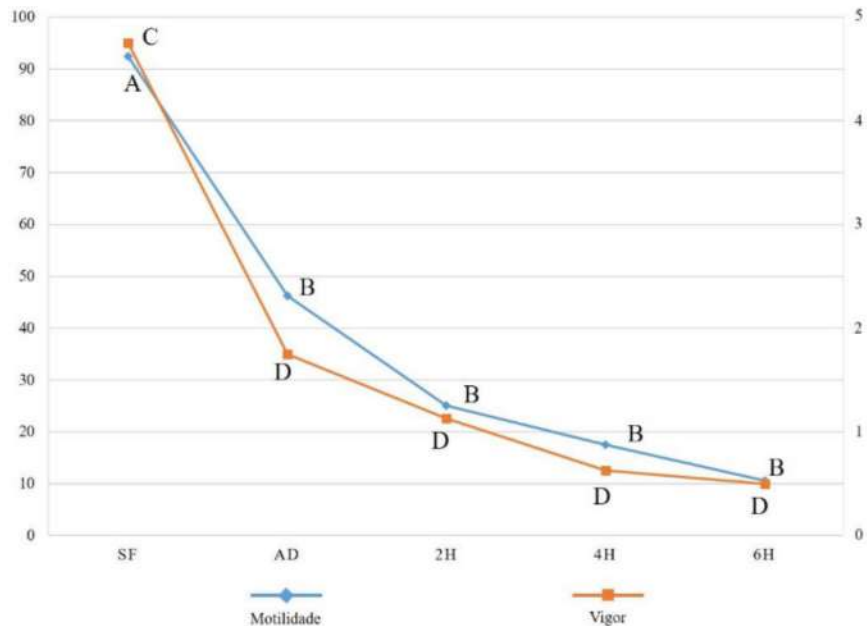
Parâmetros espermáticos	SF	AD	Resfrigeração		
			2h	4h	6h
Motilidade (%)	92,5±13,8 ^A	46,2±44,3 ^B	25,1±34,9 ^B	17,5±30,5 ^B	10,6±24,2 ^B
Vigor (0 - 5)	4,75±0,4 ^A	1,75±1,6 ^B	1,13±1,4 ^B	0,63±1,06 ^B	0,50±1,07 ^B
Viabilidade (%)	79,3±14,8 ^A	70,2±20,5 ^{AB}	48,7±20,4 ^B	49,8±23,5 ^B	41,7± 25,5 ^B
Membrana funcional (%)	84,6±15,1 ^A	65,3±31,7 ^A	65,1±21,0 ^A	62,6±30,4 ^A	60,3±31,8 ^A
Morfologia normal (%)	76,1±10,5 ^A	53,8±18,0 ^A	58,5±22,3 ^A	55,7±21,8 ^A	59,0±8,12 ^A

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre os diferentes tempos (p<0,05).

Durante o processo de criopreservação, muitos fatores influenciam a qualidade e a viabilidade do sêmen, incluindo a técnica de coleta, o meio diluente, o processamento do sêmen e a concentração final de espermatozoides

(UCHOA *et al.*, 2012). Assim como descrito por Aquino-Cortez *et al.* (2003b), foi observada uma grande variabilidade individual dos animais na qualidade seminal após refrigeração, no qual o sêmen de alguns animais aparentemente

apresentava-se mais sensível ao processo de refrigeração (AQUINO-CORTEZ *et al.*, 2003a).



Letras maiúsculas diferentes na figura implicam em diferenças entre tempos de um mesmo parâmetro ($p < 0,05$).

Figura 1: Motilidade e vigor (%) espermáticos observada durante a refrigeração de sêmen de cães portadores de prostatomegalia, a 4 °C, com diluente à base de TRIS-gema-glicerol.

O diluente TRIS, acrescidos de gema de ovo e na temperatura de 4 °C, é comumente considerado como a melhor opção para o sêmen canino refrigerado (OLIVEIRA, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2007). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo foram inferiores aos trabalhos descritos anteriormente. Acredita-se que o fato de todas as amostras apresentarem hemospermia possa ter influenciado a qualidade espermática durante a refrigeração, tendo em vista que o sangue foi caracterizado como espermicida (ENGLAND e ALLEN, 1992;

ZAMBELLI *et al.*, 2012). A hemospermia foi observada no LP nos ejaculados de todos os animais, sendo uma alteração esperada em animais com prostatomegalia (ZAMBELLI *et al.*, 2012). A prostatomegalia foi consequência de uma próstata hiperplásica, altamente vascularizada e, por conseguinte, foi comum a presença de sangramento no momento da ejaculação ou na urina desses animais (ROMAGNOLI, 2002; SMITH, 2008).

No momento da criopreservação, além dos diluentes, foi comum a utilização de crioprotetores externos,

como a gema de ovo, e crioprotetores internos, como o glicerol (OLIVEIRA, 2003). Como o processo de refrigeração é uma etapa da congelação do sêmen na espécie canina, foi aceitável a adição de ambos os crioprotetores, ainda em temperatura ambiente, e que esses permaneçam durante todas as etapas da criopreservação, não sendo relatados quaisquer prejuízos na qualidade do sêmen (BARBOSA *et al.*, 2009).

Com o sêmen diluído, os resultados de morfologia com o diluente TRIS em todos os tempos de refrigeração do presente estudo (2h, 4h, 6h) discordam de outros trabalhos, que se utilizaram dos mesmos intervalos de curva de refrigeração (OLIVEIRA, 2003). Os parâmetros de viabilidade, funcionalidade de membrana e morfologia do sêmen diluído por até 6h, apesar de serem considerados normais por Oettlé (1993) e pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), são inferiores aos citados na literatura, utilizando-se as mesmas condições de refrigeração com o diluente leite-gema em cães sem alterações prostáticas (MOTA-FILHO *et al.*, 2007) e Tris-gema (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Quando comparado com o presente estudo, Nascimento *et al.* (2007) encontraram bons resultados de refrigeração, por até 36h, na temperatura

de 4 °C, utilizando-se o diluente Tris-gema; valores esses apresentados utilizando-se o sêmen de cães com até 2 anos, que apresentavam motilidade superiores a 80% (SF) e diluídos na proporção de 1:2 (sêmen/diluente), acrescido de antibiótico. Com 36h, o sêmen apresentava valores de 61,9% de motilidade, viabilidade de membrana de 92,5% e 71,1% de espermatozoides com morfologia normal.

Nossos resultados não são compatíveis com os já relatados, quando se utilizou o diluidor TRIS para a refrigeração do sêmen canino (UCHOA *et al.*, 2012). Em nosso experimento, no final das 6 horas de refrigeração, o sêmen apresentou motilidade de $10,63 \pm 24,27$, inviabilizando a sua posterior utilização em programas de inseminação artificial intravaginal, já que para esta técnica, se fez necessária uma motilidade espermática superior a 50% (CONCANNON e BATISTA, 1989).

Estudos demonstraram que o LP de cães sadios, quando exposto aos espermatozoides epididimários levaram a um aumento na motilidade (KOROCHKINA *et al.*, 2014). Acredita-se que esta ação benéfica do LP seja devido a componentes bioquímicos presentes no plasma seminal (AQUINO-CORTEZ *et al.*, 2003a). Entretanto, pesquisas que determinem quais

componentes do plasma seminal melhoram a motilidade espermática e quais são prejudiciais ainda não foram determinados na espécie canina.

Patologias prostáticas puderam ocasionar importantes alterações bioquímicas no plasma seminal, interferindo na qualidade reprodutiva dos animais (MOTHEO *et al.*, 2014), o que poderia justificar a queda brusca na motilidade espermática e no vigor observados neste trabalho. A prostatomegalia é responsável por provocar alterações constitucionais no LP (AQUINO-CORTEZ, 2017); acredita-se que essas alterações foram capazes de influenciar nossos resultados. Desta forma, sugere-se que mais estudos sejam realizados, a fim de verificar tal hipótese, já que alterações no fluido seminal comprometeram diretamente a fertilidade (MOTHEO *et al.*, 2014).

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que sêmen refrigerado de cães com prostatomegalia apresentam baixa qualidade seminal, sendo inviável e insatisfatório para programas de reprodução assistida.

REFERÊNCIAS

- ALCANTAR-RODRIGUEZ, A.; MEDRANO, A. The effect of cooling to different subzero temperatures on dog sperm cryosurvival. *Reproduction in Domestic Animals*, v.52, p.422-428, 2017.
- ALMEIDA, L.E.F. Viabilidade espermática do sêmen de cães, nas 24 e 48 horas após a diluição e resfriamento em container para transporte. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1998.
- AQUINO-CORTEZ, A.; CORTEZ, A.A.; CARDOSO, R.C.S; SILVA, L.D.M. Características físico-químicas do líquido prostático canino antes e após a congelação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.1, p.17-21, 2003a.
- AQUINO-CORTEZ, A.; CORTEZ, A.A.; SILVA, M.C.; BEZERRA, J.S.; OLIVEIRA, M.L.M.; SILVA, V.R.C; CRISÓSTOMO, F.S.M., Qualidade de espermatozoides caninos diluídos em líquido prostático autólogo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.326-327, 2003b.
- AQUINO-CORTEZ, A.; SILVA, M.C.; CORTEZ, A.A.; SILVA, V.R.C.; CRISÓSTOMO, F.S.M.; SILVA, L.D.M. Comparação dos parâmetros espermáticos e bioquímicos do líquido prostático de cães da raça pastor Alemão e Rottweiler.

- Revista Acta Veterinaria Brasilica, v.8, n.2, 2014.
- AQUINO-CORTEZ, A.; PINHEIRO, B.Q.; SILVA, H.V.R.; LIMA, D.B.C.; SILVA, T.F.P.; SOUZA, M.B.; VIANA, D.A.; XAVIER JÚNIOR, F.A.F.; EVANGELISTA, J.S.A.M.; BRANDÃO, F.Z.; SILVA, L.D.M. Serum testosterone, sperm quality, cytological, physicochemical and biochemical characteristics of the prostatic fraction of dogs with prostatomegaly. *Reproduction in Domestic Animals*, v.00, p.1-6, 2017. <https://doi.org/10.1111/rda.13009>
- ATALAN, G.; HOLT, P.E.; BARR, F.J. Ultrasonographic estimation of prostate size in normal dogs and relationship to bodyweight and age. *Journal of Small Animal Practice*, v.40, p.119-122, 1999.
- BARBOSA, C.C; MADEIRA, V.L.H; JUCÁ, R.P.; OLIVEIRA, A.C; UCHOA, D.C; SILVA, L.D.M. Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (acp-106[®]): efeito da temperatura de adição do glicerol (27 e 4°C). *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.4, p.1207-1215, 2009.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte. 3ª ed., 49p., 2013.
- CHIRINÉA, V.H.; SICHERLE, C.C.; LOPES, M.D. Congelamento de sêmen e sua eficiência na inseminação artificial de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.37, n.2, p.164-168, 2013.
- CHRISTIANSEN, I.J. Andrologia do Macho Normal. Reprodução no cão e no gato. 1ª ed., Manole Ltda, 362p., 1988.
- CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk R.W. (Ed), *Current veterinary therapy*. Philadelphia: WB Saunders, p.1247-1259, 1989.
- ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozenthawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, v.46, n.1, p.165-171, 1996.
- ENGLAND, G.C.W.; RUSSO, A.M.; FREEMAN, B.S.L. The bitch uterine response to semen deposition and its modification by male accessory gland secretions. *The Veterinary Journal*, v.195, p.179-184, 2012.
- ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, v.37, v.2, p.373-381, 1992.
- HOLT, W.V. Basics aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.3-22, 2000.
- IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN J.P. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, v.55, p.671-684, 2001.

- JOHNSTON, S.D.; KAMOLPATANA, K.; ROOT-KUSTRITZ, M.V.; JOHNSTON, G.R. Prostatic disorders in the dog. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.405-415, 2000.
- KAMOLPATANA, K.; JOHNSTON; JOHNSTON, G R.; JOHNSTON, S.D. Determination of canine prostatic volume using Trans abdominal ultrasonography. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v.41, p.73-77, 1999.
- KOROCHKINA, E.; JOHANNISSON, A.; LAVANYA, G.; MORRELL, J.M.; AXNER, E. Effect of prostatic fluid on the quality of fresh and frozenthawed canine epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, v.82, p.1206-1211, 2014.
- LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 21, v.3, p.467-485, 1991.
- MOTA-FILHO, A.C.; CASTELO, T.S.; COSTA, L.L.M.; LIMA, G.L.; SILVA, A.R. Conservação do sêmen canino sob refrigeração em diferentes caixas isotérmicas, *Acta Veterinaria Brasílica*, v.1, n.3, p.78-83, 2007.
- MOTHEO, T.F.; MOSTACHIO, G.Q.; RIBEIRO, A.P.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D.; RICARDO, W.; VICENTE, R. Semen parameters and seminal plasma protein and biochemical profiles of dogs with benign prostatic hyperplasia after botulinum toxin type an intraprostatic injection. *Ciência Rural*, v.44, n.6, p.1113-1118, 2014.
- NASCIMENTO, M.V.; MOTA-FILHO, A.C.; SILVA, A.R. Acondicionamento de sêmen canino para transporte utilizando diferentes diluentes. *Ciência Animal*, v.17, p.37-44, 2007.
- OETILÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.47, p.257-260, 1993.
- OLIVEIRA, E.C.S. Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino. 2003, 61p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.
- PAYAN-CARREIRA, R.; MIRANDA, S; NIZANSKI, W. Artificial insemination in dogs. In: Manafi M (Ed.). *Artificial insemination in farm animals*. 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-nimals/artificial-insemination-in-dogs>.
- QUINTELA, A.T.; OLIVEIRA, I.R.S.; SOUZA, A.O.; GUSMÃO, A.L.; SILVA, A.R.; Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. *Animal Reproduction*, v.7, n.2, p.70-74, 2010.
- ROMAGNOLI, S. Infertility in the male dog - A diagnostic approach - Infertilidade

- no cão - Abordagem clínica. Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, SPCV, Oeiras, p.171-176, 2002.
- SAGOLS, E.; NAVARRO, C. Follow up of CPSE concentrations after Osaterone treatment in dogs. 16° EVSSA Congress. Reproduction and pediatrics in dogs, cats and exotics. Toulouse, France, p.169, 2013.
- SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. Veterinary Record, v.138, p.154-157, 1996.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. Theriogenology, v.65, p.958-978, 2006.
- SMITH, J. Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. Theriogenology, v.3, p.375-83, 2008.
- TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermativparameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawedv bull semen. Theriogenology, v.62, p.1.245-1.252, 2004.
- UCHOA, D.C.; SILVA, T.F.P.; CARDOSO, J.F.S.; FILHO, A.C.M.; JUCÁ, R.P.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c), Theriogenology, v.77, p.1959-1965, 2012.
- ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. GENTILINI, F. Validation of a model to develop a symptom index for benign prostatic hyperplasia in dogs. Reproduction in domestic animals, v.47, Suppl 6, p.229-231, 2012.