



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**Panorama da produção científica sobre a criopreservação de
sêmen canino entre os anos de 2010 a 2020**

Revisão de Literatura

Viviani Netto Domingues

Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato

BRASÍLIA – DF

DEZEMBRO/2020



VIVIANI NETTO DOMINGUES

**Panorama da produção científica sobre a criopreservação de
sêmen canino entre os anos de 2010 a 2020**

Revisão de Literatura

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof.Dr. Ivo Pivato

BRASÍLIA – DF

DEZEMBRO/2020

Ficha Catalográfica

| | |
|--------|---|
| ND671p | Netto Domingues, Viviani Panorama da produção científica sobre a criopreservação de sêmen canino entre os anos de 2010 a 2020: Revisão de Literatura / Viviani Netto Domingues; orientador Ivo Pivato. -- Brasília, 2020. 39 p. |
| | Monografia (Graduação - Medicina Veterinária) -- Universidade de Brasília, 2020. |
| | 1. biotécnicas. 2. reprodução. 3. cães. 4. diluente. 5. crioprotetor. I. Pivato, Ivo , orient. II. Título. |

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Viviani Netto Domingues

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Panorama da produção científica sobre a criopreservação de sêmen canino entre os anos de 2010 a 2020: Revisão de literatura.

Ano: 2020

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Viviani Netto Domingues

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: DOMINGUES, Viviani Netto

Título: Panorama da produção científica sobre a criopreservação de sêmen canino entre os anos de 2010 a 2020: Revisão de literatura.

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em 15/12/2020

Banca Examinadora

Prof. Ivo Pivato

Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof.a Juliana T. S. A. e Macêdo

Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Andrei A. Fidelis

UNICEUB

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Esse trabalho é dedicado aos meus filhos Heitor e Filipe, que são o motivo da minha persistência. Também dedico ao meu marido Thiago Penna, que contribuiu com a realização de mais esse sonho com todo carinho e paciência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à vida, por ter me presenteado ao longo dos anos em que estive na faculdade com dois filhos, com eles amadureci e aprendi muito mais sobre mim e sobre nossa passagem na Terra do que jamais aprenderia sem eles. Meus amores, muito obrigada por me ensinarem a persistir mesmo achando que não consigo e obrigada por terem me tornado a mulher que sou hoje.

Aos meus pais, Fernando e Rosangela que sempre me proporcionaram o que podiam em cada fase da minha vida e que continuam acreditando nos meus planos, estando sempre ao meu lado mesmo eles dando certo ou errado! O apoio de vocês sempre me deu asas pra buscar aquilo que acredito e por isso sou extremamente grata por tudo que fizeram por mim! Amo vocês demais.

Ao meu cúmplice, amigo, namorado e marido que engatou nesta vida comigo desde o primeiro dia que estivemos juntos. Ao longo desses anos nós amadurecemos de uma forma que me orgulha muito olhar pra trás e reconhecer que hoje somos pessoas muito melhores do que já fomos e seremos muito melhores amanhã do que somos hoje. Obrigada pela paciência que teve com o nosso nós, valeu a pena!

Agradeço também aos inúmeros colegas e professores que tive em toda minha trajetória acadêmica, cada pessoa que passou pela minha vida deixou um pouquinho de si que levou a minha construção pessoal.

Também agradeço aos meus amigos de quatro patas, tanto aos que já se foram quanto aos que se formam comigo! De todas as formas aprendi, seja a prática da medicina veterinária ou a valores pessoais. A vida se torna muita mais rica e divertida quando temos animais como amigos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | vi |
| LISTA DE TABELAS..... | vii |
| LISTA DE GRÁFICOS..... | viii |
| RESUMO..... | ix |
| ABSTRACT..... | x |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. PARTE I – REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 Métodos de Coleta de Sêmen Canino | 3 |
| 2.2 Avaliação Espermática..... | 5 |
| 2.2.1 Volume..... | 5 |
| 2.2.2 Coloração..... | 5 |
| 2.2.3 pH e osmolaridade..... | 6 |
| 2.2.4 Motilidade e vigor..... | 6 |
| 2.2.5 Morfologia..... | 7 |
| 2.2.6 Concentração | 8 |
| 2.2.7 Teste hiposmótico..... | 9 |
| 2.3 Diagnóstico e Emissão de Laudo..... | 9 |
| 2.4 Criopreservação de Sêmen..... | 10 |
| 2.4.1 Diluentes..... | 11 |
| 2.4.2 Crioprotetores..... | 11 |
| 2.4.3 Refrigeração..... | 12 |
| 2.4.4 Congelação..... | 14 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| 2.4.5 Descongelamento..... | 15 |
| 3. PARTE II – MATERIAL E MÉTODOS..... | 15 |
| 4. RESULTADO E DISCUSSÃO..... | 17 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 24 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 26 |
| ANEXO..... | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

min – minutos

mL – mililitros

N₂ – nitrogênio

°C – graus Celsius

Sptz – espermatozoide

IA – inseminação artificial

pH – potencial hidrogeniônico

TCC – trabalho de conclusão de curso

SciELO - *Scientific Electronic Library Online*

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

BVS-Vet – Biblioteca Virtual em Saúde Veterinária

CRMV – Conselho regional de Medicina Veterinária

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FMZ-USP – Faculdade de medicina veterinaria e zootecnia da universidade de São Paulo

BIREME – Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - Resumo dos trabalhos avaliados ressaltando os temas, conclusões e os anos de publicação, 2020 | 22 |
|--|----|

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 – Análise quantitativa da produção científica sobre criopreservação de sêmen canino entre os anos de 2010 a 2020..... 18

GRÁFICO 02 - Análise qualitativa dos assuntos abordados pelos trabalhos avaliados..... 19

RESUMO

Esta revisão teve como objetivo analisar a produção científica sobre criopreservação de sêmen canino entre os anos de 2010 e 2020 em dois repositórios de dados científicos. A produção encontrada foi quantificada e qualificada. A triagem dos artigos selecionados obedeceu aos seguintes critérios: Estar dentro do recorte temporal de 2010 a 2020, para tanto, foram selecionados nos motores de busca os anos que compreendem esta década; constar nas bases de dados da *Scielo* e *BVS-Vet*. A análise do título e resumo não ficaram limitadas as palavras-chave utilizadas nos motores de busca, caso a publicação mostrasse resultados pertinentes ao assunto abordado, esta era selecionada. No ano de 2010 foram contabilizadas 02 (5,5%) produções; 04 (11,1%) em 2011; 02 (5,5%) em 2012; 05 (13,8%) em 2013; 03 (8,3%) em 2014; 01 (2,7%) em 2015; 03 (8,3%) em 2016; 5 (13,8%) em 2017; 5 (13,8%) em 2018; 04(11,1%) em 2019; 02 (5,5%) em 2020. A análise documental permitiu caracterizar os trabalhos por assunto, revelando 10 tópicos de interesse: diluentes; centrifugação; epidídimo; crioprotetores; osmolaridade; nutrição; descongelação; armazenamento; biomarcador e ultracongelamento. A avaliação das tendências temáticas revelou a prevalência de estudos sobre crioprotetores, embora existam outros temas que também sejam considerados significativos. Entretanto, é importante ressaltar que o baixo número de trabalhos envolvendo os outros assuntos pode indicar que o tema em questão já foi esgotado ou há uma desatenção sobre a importância do mesmo.

Palavras-chave: crioprotetor; diluente; cães; bibliométrico; reprodução; biotécnicas.

ABSTRACT

This review aimed to analyze the scientific production about cryopreservation of canine semen between the years 2010 and 2020 in two repositories of scientific data. The production found was quantified and qualified. The screening of selected articles followed the following criteria: Being within the time frame from 2010 to 2020, for this purpose, the years that comprise this decade were selected in the search engines: Scielo and VHL-Vet databases. The analysis of the title and abstract were not limited to the keywords used in the search engines, if the publication showed results relevant to the subject addressed, it was selected. In 2010, 02 (5.5%) productions were recorded; 04 (11.1%) in 2011; 02 (5.5%) in 2012; 05 (13.8%) in 2013; 03 (8.3%) in 2014; 01 (2.7%) in 2015; 03 (8.3%) in 2016; 5 (13.8) in 2017; 5 (13.8%) in 2018; 04 (11.1%) in 2019; 02 (5.5%) in 2020. The documental analysis allowed to characterize the works by subject, revealing 10 topics of interest: thinners; centrifugation; epididymis; cryoprotectants; osmolarity; nutrition; thawing; storage; biomarker and deep freezing. The assessment of thematic trends revealed the prevalence of studies on cryoprotectants, although there are other themes that are also considered significant. However, it is important to note that the low number of works involving other subjects may indicate that either the topic in question has already been exhausted or there is a lack of attention on its importance.

Keywords: cryoprotectant; diluent; dogs; bibliometric; reproduction; biotechniques

1. INTRODUÇÃO

A produção científica é constituída da elaboração documental sobre um tema delimitado com uma finalidade previamente determinada, que expande a compreensão da natureza do assunto examinado. O produto das pesquisas serve como parâmetro para vários indicadores, como a avaliação do desenvolvimento do país ou região, para direcionar e nortear programas de investimentos, avaliar as demandas dos pesquisadores, dentre outros aspectos. A importância da avaliação da produção científica serve para o balizamento das políticas públicas de incentivo à ciência e a produção tecnológica sendo influenciada pelas discrepâncias entre as áreas de acordo com a quantidade e qualidade de produção. (FAPESP, 2010; ALVES, 2013).

As universidades públicas possuem um papel de elevada importância no suporte da produção científica no Brasil. No ano de 2010, foi observado que, quando avaliado as nove instituições que mais produziram conteúdo científico, oito destas eram de acesso público gratuito, sendo responsáveis por mais da metade da geração de conteúdo científico no país. Entre os anos de 2002-2006 colaboraram na produção nacional de conteúdo científico em cerca de 90% (CHIARINI & VIEIRA, 2012; FAPESP, 2010).

Entretanto, nota-se uma lacuna quando o assunto em questão é a inseminação artificial em cães de companhia. Por ser uma área em crescimento, a falta de estudos bibliométricos quantitativos e qualitativos com recortes temporais amplos pode influenciar negativamente no direcionamento de esforços e investimentos financeiros para área em questão (COLOMBO et al 2017; SILVA et al., 2003).

Na metade do século XX a produção animal tomou maiores proporções como atividade comercial. Para acompanhar o aumento da demanda, as técnicas de reprodução tiveram necessidade de ser aprimoradas para aumentar o desempenho e a adaptação às variações ambientais (SEVERO, 2015).

Embora os primeiros experimentos científicos acerca do uso de IA e técnicas assistidas de reprodução em cães ter seu início no final do século XVII, o

progresso na área evoluiu de forma lenta mundialmente. Os relatos ligados à IA pós-Spallanzani surgiram no final da década de 50. Somente durante a década de 90 houve um aumento de interesse no aprimoramento das biotécnicas da reprodução de pequenos mamíferos (GONÇALVES, 2008; SILVA et al., 2003).

Desse modo, esta revisão tem como objetivo analisar quantitativamente e qualitativamente a produção científica sobre criopreservação de sêmen canino entre os anos de 2010 e 2020 em dois repositórios de dados científicos. Deste modo, após discorrer sobre a revisão de literatura e dos procedimentos metodológicos, o presente artigo analisa e interpreta a bibliometria desse apanhado sobre criopreservação de sêmen canino.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Métodos de Coleta de Sêmen Canino

Spallanzani ao descrever a primeira inseminação artificial (IA) relatou a técnica de obtenção do ejaculado a partir da manipulação digital, que consiste no estímulo manual na região do bulbo peniano. Esta manipulação promove o ingurgitamento do pênis junto a sua exposição que deve ser feita até a passagem do prepúcio pelo bulbo. Este tem sido até hoje o método mais utilizado pelos médicos veterinários para a obtenção de amostras de sêmen (JOHNSTON et al., 2001, VICENTE & APPARÍCIO, 2015). Este método permite a obtenção do ejaculado de melhor qualidade em relação às outras técnicas e seu emprego em cães não condicionados se mostra simples e confiável, além de seu baixo custo (BOUCHER et al., 1958). Outros métodos já foram descritos para a coleta de sêmen canino, dentre eles destacam-se a vagina artificial, o eletroejaculador e a recuperação espermática da cauda de epidídimo após procedimento de orquiectomia ou morte do animal (HARROP, 1955; CHRISTIANSEN, 1988; VICENTE & APPARÍCIO, 2015).

O ejaculado canino é composto por três partes distintas que podem ser diferenciadas no ato da coleta da amostra. A primeira fração que varia de 0,5 a 5mL e a terceira que varia entre 2,5 a 80mL, a depender da raça do animal, são oriundas da próstata e possuem aspecto aquoso e transparente. Essas frações têm funções de limpeza do canal uretral e aumento de volume do ejaculado, facilitando o transporte espermático pela cérvix, respectivamente. A segunda fração, que varia de 01 a 04mL, é rica em espermatozoides (sptz.) e apresenta aspecto mais espesso que as outras frações, sua coloração varia de branco leitoso a translúcido à depender da quantidade de células espermáticas presentes.

Para a realização da coleta de sêmen por manipulação digital são necessários apenas um funil e um tubo graduado. Estes devem estar pré-aquecidos para não causar choque-térmico na amostra, para isso pode-se preparar um recipiente semelhante a uma mamadeira infantil que servirá como recipiente de banho-maria à 38°C para o tubo graduado em um isopor próprio

(VICENTE & APPARÍCIO, 2015). Para que o cão tenha estímulo de cópula, faz-se necessário uma massagem sobre o prepúcio, mais precisamente na região do bulbo peniano. No início da ingurgitação do pênis o prepúcio deve ser posicionado atrás do bulbo da glândula onde a palma da mão deve manter uma pressão constante. A primeira fração prostática e a fração espermática do ejaculado é expulsa logo após o início dos movimentos pélvicos do animal e nesta fase deve-se ter cuidado para não lesionar o pênis durante a colheita. Durante a cópula natural, após a fixação do pênis na vagina da fêmea, o macho desmonta e gira 180°, permanecendo de costas para a fêmea por mais algum tempo para completar a ejaculação. Quando o animal é coletado, o operador deve permitir a mimetização deste comportamento, de modo que após iniciar o processo de coleta, a pata passe por cima do braço fazendo uma rotação de 180° do pênis e nesta fase inicia-se a ejaculação da fração espermática e por fim da fração prostática pós-espermática (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015).

Variações referentes às reações frente à coleta de sêmen são individuais e por isso proporcionar um ambiente calmo e de preferência sem outros animais que possam distrair o cão facilita a colheita. A maioria dos machos ejacula na ausência da fêmea, porém, segundo AMANN (1986), a presença de uma fêmea em estro melhora a qualidade do ejaculado estando associado ao aumento da concentração espermática. Para casos de indisponibilidade da fêmea em cio no momento da coleta, o uso de zaragatoas contendo secreções vaginais e o uso de feromonas sintéticas como metil p-hidroxibenzoato se tornam métodos eficientes para a melhoria da libido do macho que interfere diretamente no ejaculado.

Ainda hoje não há protocolos padronizados para os períodos de colheita de sêmen em cães. Alguns autores sugerem um período de repouso sexual de quatro a cinco dias. Um repouso sexual maior de dez dias faz com que a percentagem de sptzs com motilidade adequada estejam diminuídas, isso se deve as alterações morfológicas dos sptzs antigos e mortos que estavam armazenados no epidídimo (FRESHMAN, 2002; FELDMAN & NELSON, 2004).

2.2 Avaliação Espermática

Após a colheita o sêmen deve ser conservado entre 35 e 37°C, sendo possível manter esta temperatura através de banho-maria ou aquecido na palma da mão. Dentre os aspectos macroscópicos a serem avaliados estão a coloração, o volume, o pH, a osmolaridade e a presença de elementos estranhos como pus, sangue ou urina (CARDOSO et al., 2005)

Aspectos microscópicos levam às avaliações da capacitação e fertilização mais precisas em relação às macroscópicas. As análises da morfologia, motilidade, vigor e concentração espermática e a integridade de membrana plasmática e acrossomal são alguns exemplos a serem avaliados (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015).

Volume

O volume é mensurado a partir da graduação do tubo coletor e uma vez que está relacionado à quantidade de secreção prostática, não é um parâmetro que caracterize qualidade da amostra, pois varia conforme a raça, idade, tamanho, clima e frequência na coleta não estando relacionado diretamente com a fertilidade do animal (SILVA et al., 2002; FELDMAN & NELSON, 2004).

Coloração

A coloração é avaliada de modo visual e espera-se que seja branco leitoso, uma vez que está relacionado à concentração celular. Contudo, a presença de células de gordura, bactérias ou mesmo células inflamatórias levam a coloração muito parecida com a normal a olho nu. Colorações anormais como amarelo, verde e vermelho podem sugerir contaminação por urina ou exsudato inflamatório, exsudado purulento ou contaminação por esmegma, doença prostática ou trauma peniano, respectivamente. Casos de azoospermia levam a coloração translúcida (FELDMAN & NELSON, 2004; KUSTRITZ, 2007; ROOT KUSTRITZ, 2007).

pH e osmolaridade

O pH normal de um ejaculado canino varia entre 6,3 a 7 e está relacionado a saúde prostática. Em casos de prostatites, o valor do pH varia e direciona a escolha do melhor antimicrobiano a ser prescrito para cães acometidos. (FRESHMAN, 2002; JOHNSTON et al., 2001). A osmolaridade do ejaculado canino varia em torno de 280 a 320 mOsmol (VICENTE & APPARÍCIO, 2015).

Motilidade e Vigor

A motilidade é caracterizada pelo percentual de sptzs móveis (CBRA, 2013) e sua avaliação deve ser uma das primeiras a ser realizada, visto que há fatores externos como a temperatura e a exposição à luminosidade podem alterar seu valor (JOHNSON, 2006; JOHNSTON et al., 2001). Existem duas formas de avaliar a motilidade espermática, a forma subjetiva ou a computadorizada. A forma subjetiva é realizada através de microscópio óptico de contraste de fase a partir de uma gota de sêmen fresco colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas e visualizada em aumento de 100 ou 200 vezes. Na espécie canina, o percentual da motilidade, varia de 0 (todas as células imóveis) a 100% (todas as células em movimento), e deve ser de no mínimo 70% para sêmen fresco e no mínimo 50% para sêmen congelado (CBRA, 2013). A motilidade está intimamente correlacionada com a função mitocondrial, uma vez que são responsáveis pelo fornecimento de adenosina trifosfato (ATP) necessário para os movimentos flagelares, que são imprescindíveis para que os sptzs migrem pelo aparelho genital da fêmea, percorram os ovidutos e fertilizem os óvulos de maneira esperada (AGARWAL et al., 2003, MARTINEZ, 2004, VOLPE, LEOCI et al., 2009).

O vigor do ejaculado é analisado no mesmo procedimento utilizado para a motilidade. Este parâmetro avalia a qualidade do movimento dos sptzs, sendo classificado segundo CBRA (2013) de 1 – 5 sendo um definido como movimento oscilatório e cinco progressivo retilíneo muito rápido. Nesta escala, o valor mínimo para o ejaculado canino é 03, sendo fresco ou congelado (CBRA, 2013).

O método computadorizado para avaliação de motilidade espermática é conhecido como CASA: *Computer Assisted Sperm Analysis* (RIGAU et al., 2001). O sistema avalia o desempenho individual do sptz e divide as populações espermáticas de acordo com a categoria de seus movimentos, sendo descartada a subjetividade humana dos resultados (RIJSSELAERE et al., 2007).

Em casos em que a amostra do ejaculado esteja demasiadamente concentrada, a avaliação da motilidade, vigor e concentração tornam-se difíceis e nestes casos faz-se necessário à diluição do sêmen em um diluidor ou, se coletada, na própria porção prostática (FELDMAN & NELSON, 2004; MARTINEZ, 2004). Alguns tipos de motilidade anormais estão relacionados a defeitos morfológicos e conseqüentemente à baixa fertilidade. Contudo, existem sptzs que carregam defeitos morfológicos, mas apresentam motilidade normal. Por isso é de grande importância a avaliação morfológica da amostra (ETTINGER & FELDMAN, 2010).

Morfologia

A avaliação da morfologia de uma amostra de ejaculado permite quantificar e qualificar as células espermáticas de acordo com seus defeitos. Estes são classificados em maiores, menores e totais. Os defeitos maiores estão relacionados à espermatogênese e interfere diretamente na fertilidade, exemplo: estruturas duplicadas e formas de cabeça atípicas. Já os defeitos menores são aqueles relacionados à maturação celular ou manipulação errônea (iatrogênica) como gota citoplasmática caudal, cabeça destacada e cauda enrolada (KRUSTRITZ, 2010). A porcentagem de defeitos maiores não deve ser superior a 10%, enquanto os defeitos menores poderão apresentar até 20% das células espermáticas. Defeitos totais não podem ultrapassar 30% (CBRA, 2013).

Existem duas formas de avaliar a morfologia espermática, a preparação do esfregaço úmida ou seca. Para o esfregaço úmido, o sêmen é fixado em formol-salina tamponado a 2,5%, deste é depositada uma gota entre lâmina e lamínula e observada em microscópio de contraste de fase. Já na técnica considerada seca, é feito um esfregaço de sêmen na lâmina de vidro e

após sua completa secagem é corado (FRESHMAN, 2002; JOHNSTON et al., 2001).

Diferentes corantes já foram descritos para a coloração de sêmen canino, entre eles estão: Karras modificado (PAPA et al., 1988), Pope (POPE et al., 1991), Spermac® (OETTLÉ, 1993), Diff-Quik (JOHNSTON et al., 2001), Eosina-nigrosina (CBRA, 2013), Giemsa (CARDOSO et al., 2013), Hematoxilina-eosina (SILVA et al., 2003), Panótico rápido (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015).

Independente da forma a ser feito o esfregaço, deve-se avaliá-lo em microscópio no aumento de 1000x sob óleo de imersão. Realiza-se a contagem de 200 células entre normais e anormais (separando-as entre os defeitos maiores e menores) (CBRA, 2013).

Concentração

A concentração espermática é avaliada a partir da segunda fração do ejaculado, uma vez que esta é rica em sptzs e é expressa pelo número de sptzs por mililitro. (SILVA et al., 2002). Para a contagem faz-se necessário a diluição em formol-salina, glutaraldeído 2,5% tamponado ou água na proporção de 1:20 (1 parte de sêmen para 19 partes de solução) (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015).

De acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) existem três formas de avaliação deste parâmetro, por espectrofotometria, método computadorizado (CASA) ou por contagem de células realizada com o auxílio da câmara hematimétrica de Neubauer.

A concentração de um ejaculado canino varia entre 200 milhões a 2 bilhões de sptzs. Tal variação é decorrente das diferenças entre raças, idade e frequência de coleta (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015). Animais jovens e geriátricos, assim como pelo excesso de coleta e consecutivamente esgotamento das reservas podem apresentar oligozoospermia (JOHNSTON et al., 2001). Em alguns casos os cães podem apresentar azoospermia, podendo decorrer de ansiedade e estimulação sexual insuficiente que ocorre na maioria das vezes pela

ausência de uma fêmea no cio ou de zangados impregnados de secreção vaginal de uma fêmea ou feromonas sintéticas (MEMON, 2007).

Teste Hiposmótico

O teste hiposmótico avalia a integridade e funcionalidade da membrana espermática (MARTINEZ, 2004), uma vez que esta estrutura está relacionada à viabilidade, capacitação e fertilização da célula no trato reprodutor da fêmea, o baixo custo e a praticidade para a realização do teste permitem sua utilização na rotina clínica com eficiência para avaliar sptzs frescos, resfriados e congelados (CHIRINÉA et al., 2003; MOCÉ & GRAHAM, 2008; QUINTELA et al., 2010).

O teste consiste na imersão dos sptzs em uma solução hiposmótica que incluem citrato de sódio, frutose, sacarose e água destilada. (ROOT KUSTRITZ, 2007; QUINTELA et al., 2010; PINTO et al., 2015). A osmolaridade desta solução deve ser entre 100-150mOsmol (BENCHARIF et al., 2010; VIEIRA & APPARÍCIO, 2015).

O período de incubação varia de 30 a 60 min à 37°C (PINTO et al., 2015; VIEIRA & APPARÍCIO, 2015), entretanto PINHO & KOZINK (2008) descrevem que a incubação por 01 minuto seja suficiente para sêmen canino. A avaliação é feita ao microscópio óptico ou de contraste de fase em aumento de 400x. São contadas 200 células e o resultado deve ser expresso em percentual. Os sptzs que possuem membrana íntegra apresentam cauda enrolada, esse dinamismo acontece pela edemaciação celular (MARTINEZ, 2004).

2.3 Diagnóstico e Emissão de Laudo

Os cães reprodutores podem ser classificados em aptos, questionáveis ou inaptos à reprodução mediante a interpretação das avaliações do espermograma. Considerando o ciclo espermático, o laudo definitivo pode ser repetido em um mês (CBRA, 2013).

2.4 Criopreservação de Sêmen

As propriedades biológicas e biofísicas dos sptzs são estritamente correlacionadas com sua composição molecular (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015). Para o processo de criopreservação do sêmen é importante conhecer a organização da membrana plasmática, uma vez que sua integridade é fundamental para o funcionamento adequado da célula. SINGER & NICHOLSON (1972) sugeriram um modelo de composição da membrana plasmática que se segue até os dias de hoje, nesse modelo a organização desta estrutura é feita a partir de uma dupla camada fosfolipídica a qual estão distribuídas proteínas de superfície e transmembranas por toda sua extensão. É de extrema importância conhecer os fatores ou as substâncias que desestabilizam ou protegem a membrana espermática nos processos de criopreservação (STĂNESCU E BÎRȚOIU, 2012).

A criopreservação é uma biotécnica reprodutiva que facilita a propagação de material genético para diferentes regiões sem a necessidade de o reprodutor estar presente e possibilita a capacidade de fecundação por tempo indeterminado (SILVA et al., 2001). Esta biotécnica é composta por duas técnicas: refrigeração (entre 04 e 15°C) e congelamento (-196°C). Os dois processos consistem na interrupção artificial temporária do metabolismo do sptz pós-ejaculado, que será restaurado no processo subsequente de fertilização (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015).

Quando o sêmen é resfriado de 37°C para 5°C a membrana espermática passa por estresse térmico e conseqüentemente há uma redução na motilidade e funcionalidade assim como na bioquímica celular acometendo a fertilidade (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015). A propriedade osmótica, as taxas de resfriamento e aquecimento e a formação de cristais de gelo intracelular (STĂNESCU E BÎRȚOIU, 2012), assim como o acúmulo de metabólitos ao longo do tempo (VERSTEGEN et al., 2005) formam os principais fatores que influenciam no sucesso da biotécnica em questão.

Qualquer um dos procedimentos de criopreservação escolhido a adição de um diluente a amostra é necessário. Os diluentes têm diversas funções, entre elas estão a proteção das membranas espermáticas, promover energia, estabilizar o pH e a pressão osmótica, assim como prevenir o crescimento bacteriano (STROM et al., 2000; JOHNSON et al., 2001).

Diluentes

Os diluentes são parte fundamental da criopreservação, eles contêm substratos para o metabolismo espermático que promovem pressão osmótica e concentrações de eletrólitos fisiológicas. Ao longo dos anos várias composições têm sido estudadas, como: citrato (HARROP, 1962; UCHOA et al., 2012), lactose (SEAGER, 1969), água de coco (CARDOSO et al., 2000) e TRIS (SILVA et al., 2003). Diluentes comerciais incluem: Clone® (STRÖM, 1997), Laiciphos 478® e Biociphos W482® (SILVA & VERSTEGEN, 1995), CaniPlus Extender®, Triladyl Canine Extender®, CaninePlus Chill® (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015) e Botudog® (DE LIMA, 2019).

Crioprotetores

Os crioprotetores são responsáveis por protegerem as células espermáticas dos danos causados pela criopreservação (CONCANNON & BATTISTA, 1989) e dentre as substâncias mais utilizadas estão gema de ovo e glicerol (PEÑA, 1998).

A gema de ovo adicionada ao diluente na porcentagem de 20% melhora os resultados pós-descongelção, isso se torna possível porque os fosfolípídeos de baixa densidade encontradas nela alteram temporariamente a composição da membrana espermática, prevenindo seu rompimento no choque-térmico (MARTINS, 2005). IGUER-OUADA & VERSTEGEN (2001) concluíram que a suplementação de gema de ovo ao extensor Tris-glicose preservou a motilidade e a integridade acrossômica, resultando no aumento do período preservação do sêmen canino.

O glicerol é um crioprotetor intracelular que atua diminuindo o ponto crioscópico do sêmen, desse jeito reduz a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015).

Refrigeração

O processo de refrigeração consiste em manter um estado de repouso da célula espermática, diminuindo assim os gastos energéticos e a produção de catabólitos tóxicos (ACIPRESTE, 2006). O sêmen canino diluído e refrigerado facilmente mantém sua viabilidade durante 24 horas, dependendo da técnica utilizada junto ao seu preparo (FELDMAN & NELSON, 2004). O meio diluidor apresenta grande importância na refrigeração do sêmen, uma vez que a interação com as células espermáticas faz com que os riscos de choque térmico diminuam, interferindo na qualidade da amostra (ACIPRESTE, 2006). O diluente escolhido e o sêmen no momento de serem misturados, devem estar na mesma temperatura. Para a refrigeração não é necessário a adição de crioprotetores intracelulares como o glicerol. (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015).

Em longo prazo o fluido prostático torna-se prejudicial para a conservação, devendo ser removido por centrifugação (RIJSSELAERE et al. 2005). Após a remoção do plasma seminal, faz-se então a ressuspensão do pellet com o diluidor na proporção de 1:2 a 1:5 dependendo da concentração inicial do ejaculado, raça, finalidade do sêmen (método de IA) e o número de cadelas a serem inseminadas. Após a diluição o sêmen é disposto em um tubo plástico, estéril e com tampa. Para evitar-se o choque-térmico na refrigeração em geladeira, faz-se necessária a estabilização da amostra colocando o tubo plástico em um recipiente de água na mesma temperatura por 3 a 4 horas (PINTO et al. 1999; VIEIRA & APPARÍCIO, 2015).

A refrigeração também pode ser feita através de caixas térmicas para esta finalidade e não necessita da estabilização como descrito em geladeira, porém é importante respeitar o volume de sêmen prescrito pelo fabricante de cada caixa. Ademais, é necessário ressaltar que os sistemas de refrigeração das caixas normalmente contam com gelos recicláveis e estes devem ser colocados

nas caixas ao mesmo tempo em que os fracos contendo as amostras. (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015)

Vários períodos de refrigeração, assim como a definição das temperaturas, têm sido descritos ao longo dos anos. LINDE-FORSBERG (1991) relata que temperaturas entre 10 e 15°C já são suficientes para a manutenção da qualidade espermática. STORNELLI et al. (2002) compararam temperaturas de refrigeração de 4 e 15°C e concluíram que a motilidade espermática após quatro dias foi maior no sêmen preservado a 15°C, porém sem diferenças nos outros parâmetros de avaliação. Já PIGNATARO et al. (2020) compararam refrigerações de amostras em temperaturas de 5 e 15°C e a curto prazo descreveram não haver diferenças nos parâmetros entre as duas temperaturas.

Dentre os estudos a respeito de refrigeração, a maioria concorda que por períodos entre 48 e 96 horas a 04 ou 05°C a qualidade é mantida a níveis de IA. Já em temperaturas de 10 a 15°C a qualidade se mantém em até 48 horas, sendo ideal que a IA seja realizada em até 24 horas (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015), contudo períodos maiores de refrigeração com potencial de fertilização já foram relatados. VERSTEGEN et al. (2005) utilizando o extensor de sêmen Tris-glucose adicionado de gema de ovo, relataram a possibilidade de estender a conservação de sêmen canino resfriado a 4°C por até três semanas. Neste estudo, na ausência da troca do meio diluidor, os espermatozoides permaneceram móveis até o 16º dia. Em outro grupo, onde o diluente foi trocado no 11º dia, observou-se motilidade espermática até o dia 21º. Uma nova troca de diluentes foi feita ao 21º dia e pode-se observar um estímulo na motilidade do spz que perdurou até o dia 27º dia, mantendo boa fertilidade por pelo menos 10 dias.

O processo de refrigeração juntamente com a composição dos diluidores e o armazenamento vem sendo estudado e melhorado ao longo dos anos, permitindo assim ultrapassar sua desvantagem em relação ao congelamento que é a curta-duração da sua viabilidade. Este processo de conservação de sêmen permite o transporte sem os custos do processamento e as complicações de transporte que o sêmen congelado apresenta, tornando-o mais acessível no transporte por aviões (IGUER-OUADA & VERSTEGEN 2001).

Para a realização da IA, o sêmen deve ser aquecido em banho-maria até o retorno da temperatura à 37°C (FELDMAN & NELSON, 2004). As amostras enviadas a outros destinos devem ser encaminhadas com um certificado veterinário, que contará com informações sobre o reprodutor e as características referentes à amostra coletada (PINTO et al. 1999).

Congelação

Muitos dos protocolos utilizados para o congelamento de sêmen canino são baseados em metodologias descritas para outras espécies. Em geral, após a colheita do ejaculado a amostra é centrifugada de 600 a 800 rpm por 5 a 10 minutos, o pellet então é ressuspendido em meio diluente com ou sem crioprotetor (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015). Contudo, o estudo feito por RIGOTO et al. (2019) com diluidor comercial Botudog® (Botupharma Biotecnologia Animal) demonstrou que os parâmetros de motilidade total, velocidade linear progressiva, velocidade curvilínea, linearidade, percentagem de sptzs rápidos e integridade de membrana plasmática e acrossomal foram superiores nas amostras que não foram centrifugadas, sendo assim o protocolo para congelação utilizando este diluente não preconiza a centrifugação prévia.

Após a diluição a amostra é envasada em palhetas de 0,5mL, lacradas com álcool polivinílico e levadas à refrigeração entre 04 e 05°C por 60 minutos, estas devem estar acomodadas em uma grade de metal na mesma temperatura das palhetas (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015). Após o período de equilíbrio, a grade de metal contendo as palhetas deve ser transferida rapidamente para uma caixa de poliestireno expandido (isopor) contendo nitrogênio líquido (N₂) na altura de 04 cm e posicionada 04 a 06 cm acima do N₂ durante 20 minutos. Entretanto, HORI et al. (2006) obtiveram melhores resultados na altura de 7 cm acima do N₂ por 10 minutos. Após esse período, as palhetas são mergulhadas no nitrogênio líquido e já podem ser armazenadas no botijão criogênico (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015). SANTANA et al (2013) observaram que a manutenção das palhetas por até dois dias na temperatura de 4°C antes de serem congeladas e armazenadas no botijão criogênico (-196°C) não diminuiu a qualidade espermática.

A velocidade de congelação tem grande influência na sobrevivência dos sptzs. Considera-se ótima uma taxa de 10 a 50°C/min. na fase de -15°C/-60°C. ROTA et al. (2005) afirmaram resultados melhores na preservação de membrana espermática no método da curva de congelação lenta, que utiliza o resfriamento inicial, em relação com o método de congelação rápida em nitrogênio, contrariamente HAY et al. (1997) utilizando curvas médias de 12 e 28°C/min. entre 0 e -70°C encontraram maior motilidade nas amostras pós-descongeladas comparadas as curvas lentas (0,5°C/min) e rápidas (99 e 214°C/min).

Uma opção as caixas de poliestireno que vem se destacando é o *dry shipper*, que é uma espécie de botijão criogênico onde o N₂ fica embebido no seu interior. O armazenamento é feito à -150°C e seu material interno não permite vazamentos durante o transporte e preserva sêmen canino pelo período de até sete dias (HENDRICKS et al 2010; BATISTA et al. 2012).

Descongelação

Diferentes temperaturas são utilizadas para a descongelação de amostras de sêmen canino, 37°C por 30 segundos, 46°C por 15 segundos ou 70-72°C por 8 segundos, em banho-maria (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015). Segundo HAMMERSTEDT et al. (1990) o método de descongelação deve seguir a taxa de congelação para que os cristais de gelo dissolvam antes da recristalização, o que causa danos à membrana e organelas dos sptzs.

ROSA (2018) observou que a centrifugação com sílica coloidal glicidoxipropiltrimetoxissilano- formulação equina-Androcoll-E® (Minitube, Germany) no pós-d descongelamento seleciona sptzs morfológicamente íntegros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização da pesquisa, caracterizada como descritiva e bibliográfica, foram estabelecidas cinco etapas básicas:

Etapa 1- estabelecimento da fundamentação teórica da coleta e cruzamento de dados;

Etapa 2- revisão bibliográfica sobre criopreservação de sêmen canino;

Etapa 3- coleta de dados no site da Scielo e do BVS-Vet utilizando as palavras “Sêmen” e “canino” no motor de busca;

Etapa 4- organização e tratamento dos dados bibliométricos dos resultados obtidos utilizando os softwares Microsoft Excel e Microsoft Word;

Etapa 5- análise e discussão dos resultados obtidos.

A pesquisa descritiva é caracterizada como um cruzamento de dados pré-existentes que objetiva conceber informações estratégicas que fundamentem a tomada de decisões. A pesquisa bibliográfica é um processo que compreende a reunião de dados produzidos acerca de um determinado tema com a finalidade de elucidar um problema evidenciado por uma proposta previamente estabelecida (MINAYO, 2001; FOWLER, 1993).

A triagem das referências selecionadas obedeceu aos seguintes critérios: estar dentro do recorte temporal de 2010 a 2020, para tanto, foram selecionados nos motores de busca os anos que compreendem esta década; constar nas bases de dados da *Scielo* e *BVS-Vet*. A análise do título e resumo não ficaram limitadas as palavras-chave utilizadas nos motores de busca, uma vez que a publicação mostrava resultados pertinentes ao assunto abordado, esta era selecionada. Um crivo adicional foi utilizado caso houvesse dúvida em relação à pertinência do artigo ao assunto sendo, nestes casos, realizada uma análise completa do texto e da bibliografia do trabalho em questão. O período de 10 anos selecionado para o estudo intenciona conceder consistência e estabilidade aos resultados analisados, além de possibilitar a análise do crescimento e o progresso das produções no período.

A Biblioteca Virtual em Saúde – Veterinária (BVS-Vet) é uma base de referência digital do conhecimento científico e técnico na área da veterinária e da zootecnia. A BVS-Vet foi criada por iniciativa da biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), com o apoio do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo (CRMV-SP) e segue o modelo de gestão da informação e do conhecimento

em saúde do Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (BIREME), Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Organização Mundial de Saúde (OMS).

O SciELO- *Scientific Electronic Library Online* – (biblioteca científica eletrônica online) é uma biblioteca eletrônica que abrange uma coleção selecionada de periódicos científicos brasileiros. O SciELO é parte do projeto de pesquisa em parceria com a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o BIREME.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Somando as duas bases de pesquisa, a busca resultou em um total de 108 trabalhos relacionados ao tema.

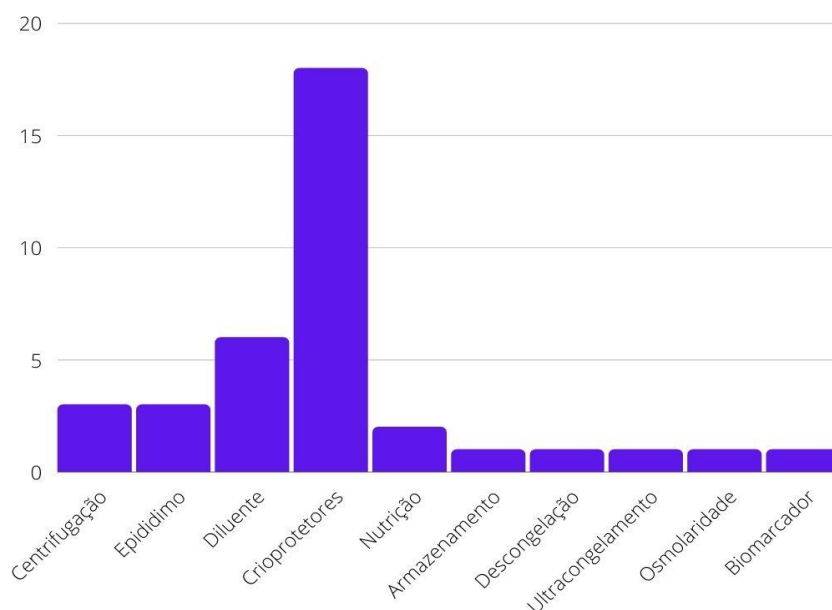
Foram identificados na base de dados *Scielo* 15 registros referentes a dissertações de mestrado, trabalhos de conclusão de curso de nível superior (TCC), artigos de periódicos e teses de doutorado que possuem as palavras “sêmen” e “canino” como palavra-chave e correspondente ao recorte temporal proposto neste trabalho.

Na base de dados *BVS-Vet* foram identificados 21 registros referentes a dissertações de mestrado, artigos de periódicos, TCC's e teses de mestrado que possuem as palavras “sêmen” e “canino” como palavra-chave correspondente ao recorte temporal proposto neste trabalho.

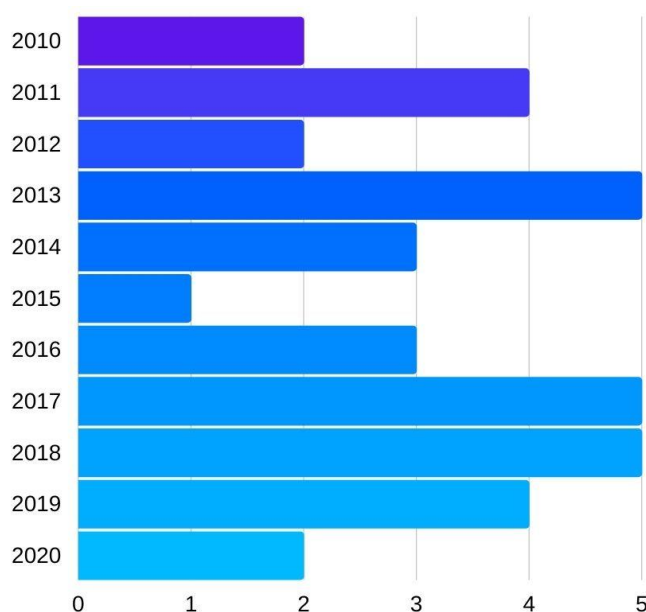
Somando as duas bases de dados, foram avaliados 36 trabalhos. Convencionou-se realizar a análise qualitativa separando os artigos em 10 assuntos (gráfico 01) 06 (16,6%) artigos foram relacionados a diluentes; 03 (8,3%) foram relacionados à centrifugação; 03 (8,3%) foram relacionados á epidídimo; 18 (50%) foram relacionados a crioprotetores; 01 (2,7%) foi relacionado à osmolaridade; 02 (5,5%) foi relacionado à nutrição; 01 (2,7%) foi relacionado à

descongelamento; 01 (2,7%) foi relacionado ao armazenam ento; 01 (2,7%) foi relacionado a biomarcador e 01 (2,7%) foi relacionado a ultracongelamento.

GRÁFICO 01 - Análise quantitativa foi realizada avaliando-se o número de publicações por ano.



No gráfico 02 é apresentada a evolução numérica de trabalhos publicados entre 2010 e 2020. No ano de 2010 foram contabilizadas 02 (5,5%) produções; 04 (11,1%) em 2011; 02 (5,5%) em 2012; 05 (13,8%) em 2013; 03 (8,3%) em 2014; 01 (2,7%) em 2015; 03 (8,3%) em 2016; 5 (13,8) em 2017; 5 (13,8%) em 2018; 04(11,1%) em 2019; 02 (5,5%) em 2020. Pode- se constatar uma média de 3,6 de trabalhos produzidos no período analisado. Nos anos de 2011, 2013, 2017,2018 e 2019 o número de trabalhos ficou acima da média, já em 2010, 2012, 2014, 2015, 2016 e 2020 a quantidade produzida ficou abaixo da média. Observa – se em 2017 e 2018 um maior número de publicações, totalizando 10 (27,7%) do total de trabalhos avaliados no período. Em contrapartida, 2015 foi ano com menor número de publicações, contabilizando apenas um no total.

GRÁFICO 02 – Análise qualitativa dos assuntos abordados pelos artigos avaliados.

A análise documental permitiu caracterizar os trabalhos por assunto, revelando 10 tópicos de interesse. O gráfico 01 ilustra os trabalhos organizados por assunto e os estrutura em quantidade produzida. Os assuntos com maior representatividade foram crioprotetores ($n = 18$; 50%), seguido por diluentes ($n=6$; 16,6%) e centrifugação e epidídimo com 3 trabalhos cada ($n= 3$;8,3%). Os resultados também mostraram baixa porcentagem de publicações relacionadas a nutrição ($n=2$;5,5%), osmolaridade ($n=1$;2,7%), descongelação ($n=1$;2,7%); biomarcador ($n=1$;2,7%); ultracongelamento ($n=1$;2,7%) e armazenamento ($n=1$;2,7%).

No geral, avaliando o gráfico 02, nota-se que os trabalhos que englobam o primeiro quinquênio (2010-2014) não seguem um padrão linear, sendo acompanhada de um crescimento negativo em 2015. Nos anos seguintes é apresentado um crescimento constante e significativo. Desconsiderando o ano pandêmico atípico de 2020, quando é avaliada a média de crescimento do último quadriênio (2016-2019) em relação ao penúltimo (2012- 2015), nota - se uma variação anual positiva com o crescimento de 35,3% do número de publicações no mesmo período de tempo.

A elevada produtividade na área de crioprotetores é evidenciada no gráfico 01 ao observar a quantidade de artigos produzidos em comparação com os outros tópicos. Nessa perspectiva, considera-se que a alta produtividade de artigos sobre crioprotetores decorre não apenas de sua reconhecida importância no cenário nacional, mas também de sua forte expansão no cenário científico internacional (BENCHARIF & DORDAS-PERPINYA, 2019).

Outra área de estudo que apresentou alta produtividade foram os diluentes. As pesquisas visam maneiras de prolongar o tempo de armazenamento e a melhoria da qualidade da amostra do ejaculado pós-descongelamento. Avaliando graficamente a frequência de publicações, pode-se inferir que os meios diluentes despertam o interesse acadêmico científico cada vez maior ao longo dos anos. Desta maneira, a melhora do meio diluidor pode prolongar o tempo de viabilidade espermática mantendo a qualidade da amostra e eliminando desta forma, um ponto negativo do sêmen resfriado (VERSTEGEN et al., 2005; MARCARENHAS, 2012).

Pouco foi publicado sobre epidídimo ao longo do período avaliado, porém nos últimos anos com o desenvolvimento das biotécnicas aplicadas ao sêmen de canídeos domésticos pós-orquiectomia ou *post mortem*, houve um avanço no interesse de preservação das espécies de canídeos silvestres, com a adaptação das técnicas de recuperação e armazenamento de sptzs epididimários a partir de cães domésticos (COSTA & MARTINS, 2008; LOPES, et al., 2020).

Os estudos coletados sobre centrifugação são recentes. Uma vez que não há consenso solidificado sobre protocolo ou necessidade de centrifugação pré-congelamento do sêmen canino (DARCADIA, 2017; ROSA, 2018; RIGOTO et al., 2018).

Ampliando a análise para os tópicos seguintes, a área da nutrição foi identificada apenas em dois trabalhos, todavia não se deve diminuir sua importância uma vez que analisado o período em de produção dos trabalhos fica evidenciado que estes são recentes o que pode indicar uma área promissora para realização de futuros estudos científicos. Considerando o fácil acesso dos tutores

às rações comerciais, as conclusões observadas nos trabalhos avaliados podem nortear o desenvolvimento de produtos com finalidades específicas pelas empresas que atuam no mercado nutricional de animais domésticos (RODRIGUES et al., 2017).

Os estudos sobre a osmolaridade dos meios já estão consolidados, pois manter a osmolaridade semelhante à do sêmen é essencial para a manutenção celular. Isso explica a falta de estudos recentes acerca do tema (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015; SÁNCHEZ & ZAMORA, 2016).

Similar ao que foi proposto a respeito da osmolaridade, o armazenamento e o descongelamento referentes ao sêmen canino, já possuem parâmetros ótimos previamente estabelecidos na literatura, sendo seus estudos relacionados hoje com meios diluentes específicos (VIEIRA & APPARÍCIO, 2015; PIGNATARO et al., 2020).

No sêmen canino, é possível utilizar biomarcadores fluorescentes que auxiliam na avaliação da integridade da membrana espermática a partir da microscopia de fluorescência. Embora PEÑA et al (2001) tenha descrito que tal técnica seja bastante eficiente, na rotina clínica pela facilidade e custo, a avaliação da integridade de membrana é realizada mediante microscopia óptica usando o corante eosina-negrosina. Mas os estudos do uso de biomarcadores não podem ser desconsiderados uma vez que seu potencial de eficiência já tenha sido descrito em alguns estudos (RIJSSELAERE et al., 2005).

O ultracongelamento é possível mediante um equipamento que consta de um microprocessador de controle de temperatura, mantendo a temperatura interna de forma programável ou não. Não há na literatura uma técnica estabelecida para o ultracongelamento de sêmen canino, contudo SALINAS (2013) utilizando um ultracongelador não programável a -80°C ($-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) demonstrou que sua eficácia pode ser correlacionada com a do N_2 líquido. Seu custo elevado e seus resultados comparáveis aos do N_2 líquido podem estar relacionados ao seu baixo número de estudos na última década.

A tabela 01 elenca em ordem anual crescente as conclusões obtidas em cada assunto. A relação dos trabalhos avaliados encontra-se no anexo I.

TABELA 01 – Resumo dos trabalhos avaliados ressaltando os temas, conclusões e os anos de publicação, 2020.

| Tópico | Conclusão | Ano |
|-----------------------|---|------------|
| | O uso de glicose e sacarose na refrigeração manteve motilidade e integridade da membrana. ¹ | 2010 |
| | A adição de benzilpenicilina benzatina associada ao diluente ACP-106® não controla o crescimento bacteriano e não tem influência na qualidade espermática pós-descongelamento. ² | 2010 |
| | Adição de 4 e 6% de glicerol apresentou melhores resultados após descongelamento em relação à 8%. ³ | 2011 |
| | Glicerol e Dimetilformamida à 5% promoveu proteção similar ao sêmen no congelamento rápido. ⁴ | 2011 |
| | Não foram observadas diferenças nas características seminais com a adição de glicerol nos diferentes estágios da curva de resfriamento. ⁵ | 2011 |
| | Lectina de soja pode ser alternativa à gema de ovo para refrigeração e criopreservação. ⁶ | 2012 |
| | Adição de dodecil sulfato de sódio em concentrações de 0,1 e 0,2% ao diluente tris-gema-glicerol não influencia na qualidade do sêmen após descongelamento. ⁷ | 2013 |
| Crioprotetores | Adição de catalase e vitamina C como antioxidante ao diluente beneficiou a integridade do acrossomo nas amostras de sêmen de cães idosos. Já nas outras amostras teve efeito deletério sobre a motilidade espermática. ⁸ | 2013 |
| | Glicerol adicionado ao diluente TRIS demonstrou-se mais eficaz quando comparado com a dimetilformamida associada ao glicerol ou trealose. ⁹ | 2014 |
| | A lipoproteína de baixa densidade (LDB) extraída da gema do ovo associada a solução de sulfato de amônia (SSA) 50% demonstrou-se tão eficiente quanto a gema de ovo para preservação dos espermatozoides na criopreservação. A LDB liofilizada não se mostrou adequada como crioprotetor. ¹⁰ | 2014 |
| | Trealose influencia positivamente no vigo e motilidade espermática quando adicionada ao meio diluente TRIS-citrato com gema de ovo. ¹¹ | 2015 |
| | Extrato de folhas de mirtilo não demonstraram melhorias na qualidade do sêmen canino. ¹² | 2016 |
| | Duas proteínas do plasma seminal podem estar relacionadas com melhores ações crioprotetoras de acordo com a qualidade espermática. ¹³ | 2017 |
| | A utilização de gema de ovo centrifugada à 10% apresentou boas propriedades crioprotetoras em sêmen epididimal, favorecendo em especial a cinética pós-descongelamento. ¹⁴ | 2017 |

| | | |
|----------------------|--|------|
| | Adição de ciclodextrina carregada com colesterol na proporção de 2mg/120 milhões de sptz melhora a qualidade seminal, já 5mg influencia negativamente. ¹⁵ | 2017 |
| | Plasma seminal atua positivamente sobre os parâmetros de motilidade e viabilidade espermática e função mitocondrial durante refrigeração a 5°C. ¹⁶ | 2018 |
| | O potencial protetor da adição de serina em diluidores de sêmen canino é dose e tempo dependente. ¹⁷ | 2018 |
| | Adição de hidroxitolueno butilado ao diluidor ACP-106c não afetou a qualidade do sêmen pós-descongelamento. ¹⁸ | 2018 |
| | A renovação do diluidor após sei dias de resfriamento até o 12 ^o melhora a motilidade e integridade seminal sem influencias a longevidade. ¹⁹ | 2012 |
| | A diluição do sêmen canino em fluido prostático autólogo ou heterólogo foram similares ao sêmen diluído com soro fisiológico. ²⁰ | 2013 |
| Diluyente | Óleo de copaíba não demonstrou melhorias na motilidade, vigor e integridade de membrana e em concentração de 008% podem favorecer a hiperativação do sptz. ²¹ | 2016 |
| | O diluyente Botudog® demonstrou ser superior na preservação das características seminais quando comparado ao meio TRIS-gema. ²² | 2019 |
| | Adição de ácido palmítico ao diluidor TRIS-gema preserva a membrana plasmática durante o congelamento. Adição de 116µM não é suficiente para preservação das estruturas espermáticas. ²³ | 2019 |
| | O diluyente comercial a base de leite foi superior na preservação da motilidade, viabilidade e integridade de membrana por um período de 36h em comparação ao diluyente preparado com gema de ovo. ²⁴ | 2020 |
| | Foi demonstrado que é possível recuperar e criopreservar sptzs epididimários em até 48h pós orquiectomia. ²⁵ | 2011 |
| Epidídimo | O acréscimo de 10% de fuido prostático ao diluyente comercial não tem efeito sobre as amostras epididimárias. Observou-se que as amostras resfriadas por até 72h entre 4 e 6°C podem ser utilizadas para inseminação artificial. ²⁶ | 2019 |
| | A recuperação de sptzs via fluxo retrógrado e flutuação em diluidor TRIS-gema podem ser utilizadas para refrigeração e criopreservação de sêmen. ²⁷ | 2020 |
| | A centrifugação pré-congelamento com sílica coloidal é tão eficaz quanto a centrifugação convencional. ²⁸ | 2017 |
| Centrifugação | O uso de centrifugação com sílica coloidal equina pós-descongelação seleciona sptzs morfologicamente íntegros. ²⁹ | 2018 |
| | O protocolo de congelamento de sêmen canino utilizando Botudog® não preconiza a centrifugação do ejaculado antes do congelamento da amostra. ³⁰ | 2019 |
| | A suplementação com ômega- e -6 durante 4 a 8 semanas melhora os parâmetros do sêmen fresco de | 2017 |

| | | |
|--------------------------|---|------|
| Nutrição | cães. Não há efeito sob a qualidade espermática após a congelação. ³¹ A suplementação com glutamina melhorou os parâmetro de vigor, motilidade e concentração de sptzs absolutos. ³² | 2018 |
| Armazenamento | A temperatura de 15°C demonstrou também ser eficaz na refrigeração de sêmen canino. ²⁴ | 2020 |
| Descongelação | Concluiu-se que as amostras de sêmen congeladas devem ser descongeladas à 37°C por 1min. ³³ | 2013 |
| Ultracongelamento | A utilização do ultracongelamento a -80°C para congelar e armazenar sptzs caninos tem potencial como alternativa à utilização de nitrogênio líquido. ³⁴ | 2013 |
| Biomarcador | Não há diferenças na utilização de fluorocromo SYBR-14 e 6-CFDA para avaliação da integridade da membrana plasmática em sêmen de chihuahua. ³⁵ | 2014 |
| Osmolaridade | A menor osmolaridade gera menor vitalidade espermática após incubação no teste hiposmótico. ³⁶ | 2016 |

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho buscou contribuir na análise e delineamento do perfil das publicações relacionadas à criopreservação de sêmen canino no período de 2010 a 2020.

Os dados evidenciados sobre criopreservação de sêmen canino reafirmam a importância da produção científica da área. No que se refere ao volume de produção científica, o Brasil e os outros países sul-americanos relacionados neste trabalho, têm registrado participação significativa, acompanhando o crescimento da área no contexto internacional e contribuindo para aumentar cada vez mais sua representatividade no cenário internacional (BENCHARIF & DORDAS-PERPINYA, 2019).

A avaliação das tendências temáticas revelou a prevalência de estudos sobre crioprotetores, embora existam outros temas que também sejam considerados significativos. Entretanto, é importante ressaltar que o baixo número

de trabalhos envolvendo os outros assuntos pode indicar que ou o tema em questão já foi esgotado ou há uma desatenção sobre a importância do mesmo.

Constata-se que, em síntese, embora limitado a análise temática da produção científica indexada nas plataformas BVS-VET e SciELO, o presente trabalho mostra as tendências das pesquisas sobre criopreservação de sêmen canino e enseja a decisão dos temas que preferencialmente podem ser encorajados no cenário de pesquisa nacional. Apesar de ser difícil mensurar todos os avanços científicos, mesmo em áreas com pequeno número de publicações, a quantificação do conhecimento é uma tendência do cenário científico mundial (LAWSON, 1990). Na área alvo do presente levantamento bibliométrico de criopreservação de sêmen canino, descortina o campo da investigação, facilitando o mapeamento e análise de temas emergentes e embrionários na produção acadêmica.

6. REFERÊNCIAS

- ACIPRESTE, A.C. Criopreservação de sêmen canino, utilizando associações de crioprotetores e dois protocolos de descongelamento. 2006. 59f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2006
- AGARWAL, A., SHARMA, R.K., NELSON, D.R.N. New sêmen quality scores developed by principal component analysis of sêmen characteristics. **J Androl**, v. 24, 2003
- ALVES, B. H. Aportes bibliométricos à produção científica nos principais periódicos da área de ciência da informação do Brasil no período de 2006- 2010. 2013. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência da Informação, Universidade Estadual Paulista, Marília, 2013.
- AMANN, R.P. Reproductive physiology and endocrinology of the dog. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 532-538.
- BATISTA, M., SANTANA, M., NIÑO, T., ALAMO, D., CABRERA, F., GONZÁLEZ, F., GRACIA, A. Sperm viability of canine and caprine semen samples preserved in a dry shipper. **Anim Reprod Sci**, v.130, p.105-110, 2012
- BENCHARIF D, DORDAS-PERPINYA M. Canine semen cryoconservation: Emerging data over the last 20 years. **Reprod Dom Anim**. 2020;00:1–5. <https://doi.org/10.1111/rda.13629>
- BENCHARIF, D., AMIRAT-BRIAND, L., GARAND, A., ANTON, M., SCHMITT, E. & DESHERCES, S. Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex and LDL (Low Density Lipoproteins). **Anim Reprod Sci**, 119(3-4), p.305-313, 2010
- BOUCHER, J., FOOTE, R.H., KIRK, R.W. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of sperm reserves. **Cornell Veterinary**, 48, 67-86, 1958

BRONZATTO, A. Inseminação artificial em cães. Garça/SP, 2009. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça) Garça/SP, 2009.

CARDOSO, R. C. S., SILVA, A. R., SILVA, L. D. M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.3/4, p.179-187. 2005.

CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., SILVA, L.D.M. Determinação da concentração espermática no sêmen de cães Pastores Alemães através da espectrofotometria. **Rev Bras Reprod Anim**, v.27, p.384-386, 2003.

CHIARINI, T.; VIEIRA, K. P. Universidades como produtoras de conhecimento para o desenvolvimento econômico: sistema superior de ensino e as políticas de CT&I. **Rev. Bras. Econ., Rio de Janeiro**, v. 66, n. 1, p. 177-132, mar. 2012.

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. **Rev Bras Reprod Anim**, v.27, p.361-363, 2003.

CHRISTIANSEN, I.J. (1988). **Reprodução no cão e no gato**. Editora Manole (São Paulo).

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3a ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

COSTA, P. M.; MARTINS, C. F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. *Univ. Ci. Saúde, Brasília*, v. 6, n. 1, p. 39-55, 2008.

DURHAM, E. R. As Universidades Públicas e a Pesquisa no Brasil. Série: Documentos de Trabalho. São Paulo: USP/NUPES, setembro, 1998.

FAPESP. Indicadores de Ciência, Tecnologia e Inovação em São Paulo. Análise da produção científica a partir de publicações em periódicos especializados. 2010. Disponível em: <http://www.fapesp.br/indicadores/2010/volume1/cap4.pdf>. Acesso em 24 jun. 2020.

FELDMAN, E. C. & NELSON, R. W. Canine and feline endocrinology and reproduction (3rd ed.). St. Louis, Mo.: Saunders, 2004

FOWLER, F. J., JR. Applied social research methods series: Survey research methods (Vol. 1, 2a ed., 1993). Newbury Park: SAGE

FRESHMAN, J. L. Semen collection and evaluation. **Clin Tech Small Anim Pract**, 17(3), 104-107, 2002

GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREIDO, R. J., FREITAS, F. J. V., Biotécnicas aplicadas á reprodução animal, págs. 181-189, 2º edição, editora **Roca Ltda.**, São Paulo, Brasil, 2008

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm; What we ask them to survive. **J. Androl.**, v. 11, p. 73-88, 1990.

HARROP, A.E. Some observations on canine semen. *Veterinary Record*, 67, 494-498, 1955

HAY, M.A. et al. Effects of cooling, freezing, and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **J. Reprod.Fertil. Suppl.**, v. 51, p. 99-108, 1997

HENDRICKS, K.E., PENFOLD, L.M., EVENSON D.P., KAPROTH, M.T., HANSEN, P.J. Effects of airport careening Xirradiation on bovine sperm chromatin integrity and embryo development. **Theriogenology**, v.73, p.267–272, 2010.

HORI, T.; ODAKA, S.; OBA, H.; MIZUTANI, T.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Effects of liquid nitrogen vapor sensitization conditions on the quality of frozenthawed dog spermatozoa. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 68, n. 10, p. 1055-1061, 2006.

IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J. Validation of sperm quality analyser (SQA) for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55, p.1143-58, 2001.

JOHNSON, C. Conceitos atuais sobre infertilidade no cão. **Waltham Focus**. v.16, p.7-12, 2006

JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OLSON, P.N.S. (2001). Canine and feline Theriogenology. W.B.Saunders (Philadelphia).

KRUSTRITZ, M.V. Clinical canine and feline reproduction: Evidence based answers. 1º edição, Iowa, EUA, editora **Offece**. 2010. p.25-27; 29-33.

LIINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended sêmen. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 21, p. 467-485, 1991.

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen of chilled extended semen. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, 1991, 21:467-485.

MARTINEZ, A.L.P. Canine fresh and cryopreserved sêmen evaluation. **Anim Reprod Sci**, v.82, p.209-24, 2004.

MEMON, M.A. Common causes of male dog infertility. **Theriogenology**, v.68, p.322-328. 2007.

MINAYO, M. C. Ciência, técnica e arte: o desafio da Pesquisa Social. In: _____. (Org.) Pesquisa social: teoria, método e criatividade. Petrópolis: Vozes, 2001, p. 09-30.

MOCÉ, E., GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. **Anim Reprod Sci**, v.105, p.104-118, 2008.

OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **J Reprod Fertil Suppl**, v.47, p.257-260, 1993.

PAPA, F.O. et al. Coloração espermática Segundo KARRAS (1950) modificada pelo emprego de (*Stryphinodendrum barbatimam*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 40, p. 115-123, 1988

PIGNATARO, T.A. et al. Diferentes diluentes e temperaturas de armazenamento para a refrigeração de sêmen canino. **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 21, Goiânia 2020

PINHO, C.R.F., KOZINK, D.M. Simplified hypoosmotic swelling test (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v.104, p.450-55, 2008.

PINTO, C.R.F., PACCAMONTI, D.L., EILTS, B.E. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. **Theriogenology**, 52, 609-616, 1999

PINTO, C.R.F., WRENCH, N., SCHRAMME, A. Simplified hypo-osmotic testing of canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.65, p.811, 2005

PONGLOWHAPAN, S., ESSÉN-GUSTAVSSON, B., FORSBERG, C.L. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. **Theriogenology**, 2004, 62:1498-1517.

POPE, C.E; ZHANG, Y.Z; DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **J. Zoo Wild Med.**, v. 22, p. 87-85, 1991

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. **Anim Reprod.**, v.7, p.70-74, 2010.

RIGAU, T., FARRÉ, M., BALLESTER, J. et al. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. **Theriogenology**, v.56, n.5, p.801-815. 2001.

RIGOTO, R. P.; GUAITOLINI, C. R. de F.; CRESPILO, A. M.; DELL'AGUA, C. de P. F.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; MAZIERO, R. R. D. Diferentes protocolos de congelação de sêmen canino para melhoria de sua cinética e viabilidade. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 22, n. 3, Anais do III Concivet 2019, p. 95-96, abr./jun. 2019.

RIJSSELAERE T., MAES, D., HOFACK, G., KRUIF, A., SOOM, A.V. Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by the Hamilton-Thorne Analyser. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.143–148. 2007.

RIJSSELAERE, T., VAN, M.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.706-19, 2005

ROOT KUSTRITZ, M. V. The value of canine semen evaluation for practitioners. **Theriogenology**, 68(3), 329-337, 2007

ROSA, A.M. Uso da sílica coloidal equina no processo de congelação do sêmen canino, **Univ. José do Rosário Vellano**, v. 1, p. 38, 2018

ROTA, A. Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa. 42p. Tese- University of Uppsala, SLU, Suécia, 1998

SEVERO, C. N., História da inseminação artificial no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.17-21, jan./mar. 2015. Disponível em www.cbra.org.br

SILVA, A.R. Avaliação andrológica de cães e gatos. **Rev Bras Reprod Anim**, v.5, p.52-55, 2002.

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, L.D.M. Criopreservação do sêmen canino: Revisão. **Ciênc. Anim.**, v.11, n.2, p.119-129, 2001

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v.59, p.821-829, 2003.

SILVA, R. A., CARDOSO, R. C., SILVA, D. M. L., Principais aspectos ligados a aplicação da inseminação artificial na espécie canina, **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2003. Disponível em: http://fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf6_2003/546_53_60.pdf,

SINGER, S. J.; NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure os cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720-731, 1972

STANESCU, M., BIRȚOIU, A.I. Freezing of dog's sperm: a review. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 17, p.7709- 7716, 2012.

STORNELLI, M.A. et al. Effects of two diferente temperatures and three different extenders on survival and longevity of chilled canine semen. **Theriogenol.**, v. 57, p. 483, 2002 (Resumo).

STROM HOLST, B., LARSON, B., FOSBERG, L., RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. **J. Reprod. Fertil.** 2000a; 119:77-83.

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

VICENTE, W.R.R.; APPARÍCIO, M. Reprodução e Obstetrícia de Cães e Gatos. São Paulo: **Medvet**, 2015. 448 p

ANEXO I

Relação dos trabalhos avaliados:

1- Refrigeración de semen canino utilizando glucosa, fructosa, trehalosa o sacarosa para prolongar la supervivencia espermática. Flores A., Jonathan, Fernández A., Víctor, Huamán U., Héctor, Ruiz G., Luis, & Santiani A., Alexei. (2010). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 21(1), 26-34. Recuperado en 29 de noviembre de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172010000100004&lng=es&tlng=es

2-Diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina no sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®). da Cunha Barbosa, Claudia; Leão Hitzchky Madeira, Victor; Parente Jucá, Ricardo; Cristina de Oliveira, Ângela; Couto Uchoa, Daniel; de Queiroz Pinheiro, Adriana; Daniel Machado da Silva, Lúcia. 2010disponível em <https://pesquisa.bvsalud.org/bvs-vet/resource/pt/vti-711941>

3-Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector. URIBE VALDERRAMA, Rubén et al . **Ces. Med. Vet. Zootec.**, Medellín , v. 6, n. 1, p. 21-30, Jan. 2011 . Available from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072011000100003&lng=en&nrm=iso. access on 29 Nov. 2020.

4-Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y Dimetilformamida. Restrepo Betancur, Giovanni, Gómez Oquendo, Jorge, & Vásquez Araque, Neil. (2011).. *Revista Lasallista de Investigación*, 8(2), 9-17. Retrieved November 29, 2020, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492011000200002&lng=en&tlng=es

5-Momento de adición del glicerol sobre la calidad espermática en la criopreservación de semen canino. Carlotto R., Gino, Fernández A., Víctor, Lira M.,

Boris, & Santiani A., Alexei. (2011). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(3), 183-189. Recuperado en 29 de noviembre de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000300002&lng=es&tlng=es.

6-Utilização da lecitina de soja para a refrigeração e criopreservação do sêmen de cães. Dalmazzo, Andressa. 2012 *São Paulo; s.n; 23/08/2012. 103 p.*

Resumo: <https://pesquisa.bvsalud.org/bvs-vet/resource/pt/vtt-1054>

7- Criopreservação de sêmen canino em diluente Tris adicionado de dodecil sulfato de sódio / Cryopreservation of canine semen in Tris extender added by sodium dodecyl sulfate. Costa, L. L. M; Castelo, T. S; Souza, A. L. P; Lima, G. L; Silva, A. R. **R. bras. Reprod. Anim.**; 37(1): 53-58, jan.-mar. 2013. tab, graf

<https://pesquisa.bvsalud.org/bvs-vet/resource/pt/vti-8198>

8-SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE REFRIGERAÇÃO ESPERMÁTICA COM VITAMINA C E CATALASE EM SÊMEN OBTIDO DE CÃES JOVENS E IDOSOS

Autor: Landim Alvarenga, Marina; Denise Lopes, Maria; Vieira Lopes, Bethania; Helena Chirinéa, Viviane; Freitas Bittencourt, Rodrigo. *Vet. Zoot.*; 20(4): 673-682, 2013. <https://pesquisa.bvsalud.org/bvs-vet/resource/pt/vti-699314>

9- Avaliação da eficácia de crioprotetores permeantes e não permeantes no descongelamento rápido e lento do sêmen canino. ACIPRESTE, Amanda Carla et al. **Ciênc. anim. bras.**, Goiânia, v. 15, n. 1, p. 107-114, Mar. 2014. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912014000100014&lng=en&nrm=iso>. access

on 29 Nov. 2020. <http://dx.doi.org/10.5216/cab.v15i1.26124>.

10- Cryoprotection effectiveness of low concentrations of natural and lyophilized LDL (low density lipoproteins) on canine spermatozoa. Eficiência de baixas concentrações de lipoproteínas de baixa densidade natural e liofilizada na crioprotetor de sptzs caninos. NEVES, M.M.; HENEINE, L.G.D.; HENRY, M. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 66, n. 3, p. 769-777, June 2014 Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-

09352014000300769&lng=en&nrm=iso>. access
on 29 Nov. 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-41626184>.

11- Efeito da Trealose adicionada ao meio de congelamento do sêmen de cão doméstico. LUANA MARESSA FREITAS. Ano 2015
https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=2531518

12- Deppe, Mariana, Pezo, Felipe, Reyes-Díaz, Marjorie, & Risopatrón, Jennie. Criopreservación de Sptzs de Canino con Extracto de Hojas de Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).2016 *International Journal of Morphology*, 34(2), 653-659. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022016000200037>

13- Correlação das proteínas do plasma seminal com a congelabilidade do sêmen de cães. LAIZA SARTORI DE CAMARGO. 2017 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO (BOTUCATU)
https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=4867063

14- Congelación de Semen Epididimal Canino con Yema de Huevo Centrifugada Freezing of Epididymal Canine Sperm with Centrifuged Egg Yolk. Restrepo B, Giovanni, Madrid R, Carlos Andrés, Prieto R, Laura, Duque C, Juan Esteban, & Usuga S, Alexandra. 2017. Congelación de Semen Epididimal Canino con Yema de Huevo Centrifugada. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4), 876-885. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13886>

15- ADIÇÃO DA CICLODEXTRINA CARREGADA COM COLESTEROL DURANTE A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO. FERNANDO HENRIQUE SUCUPIRA SARTO. 2017 UNIVERSIDADE PARANAENSE
https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=5837104

16- Avaliação do sêmen refrigerado com ou sem plasma seminal e sua correlação com as proteínas do ejaculado de diferentes raças caninas.
Autor: MICHELLE SILVA ARAUJO..2018. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO (BOTUCATU)

17- Efeito da adição de serina no diluente de resfriamento nos parâmetros de cinética espermática de caninos. MARIA EDUARDA BICCA DODE. 2018 https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=5602537

18- SILVA, Herlon Victor Rodrigues et al. ADIÇÃO DE HIDROXITOLUENO BUTILADO (BHT) NO DILUIDOR ACP-106c PARA CONGELAÇÃO DE SÊMEN CANINO. 2018 **Ciênc. anim. bras.**, Goiânia, v. 19, e45896, 2018. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912018000100209&lng=en&nrm=iso>. access on 29 Nov. 2020. Epub July 30, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-6891v19e-45896>.

19- Renovação do diluidor na qualidade do sêmen canino resfriado
Autor: Mascarenhas, Rebeca Marques. 2012: <https://pesquisa.bvsalud.org/bvs-vet/resource/pt/vtt-712>

20- Efecto de la adición de fluido prostático autólogo y heterólogo sobre la calidad espermática del semen canino. Sánchez R, Alfonso, & Bravo V, Cristóbal. (2013). **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, 24(4), 466-472. Recuperado en 29 de noviembre de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172013000400008&lng=es&tlng=es.

21- AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE COPAÍBA (COPAIFERA PUBIFLORA) SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CANINO REFRIGERADO E CRIOPRESERVADO. OTAVIO LUIS DE OLIVEIRA HENRIQUES PAULO. 2016 https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=4183649

22- EFEITO DE MEIOS DILUIDORES NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN CANINO. JONATHAN SOARES DE LIMA. 2019 UNIVERSIDADE

PARANAENSE Programa: CIÊNCIA ANIMAL COM ÊNFASE EM PRODUTOS BIOATIVOS (40028011002P4) https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7805350

23- EFEITO DA ADIÇÃO DO ÁCIDO PALMÍTICO E DA VITAMINA E AO DILUIDOR TRIS-GEMA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO. MARCOS ANTONIO CELESTINO DE SOUSA FILHO. 2019 FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7571611

24 PIGNATARO, Tatiana Almeida et al . Comparison of extenders and storage temperature in chilling canine semen. **Ciênc. anim. bras.**, Goiânia , v. 21, e-52499, 2020 Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912020000100303&lng=en&nrm=iso>. access on 29 Nov. 2020. Epub June 01, 2020. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v21e-52499>.

25- Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar sptzs obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía. Armas R., Sandra, Fernández A., Víctor, Vásquez C., María, & Santiani A., Alexei. 2011). **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, 22(3), 199-205. Recuperado en 29 de noviembre de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000300004&lng=es&tlng=es.

26- SELEÇÃO ESPERMÁTICA EM AMOSTRAS EJACULADAS E EPIDIDIMÁRIAS DE CÃES DOMÉSTICOS E EFEITO DA ADIÇÃO DE FLUIDO PROSTÁTICO. LINA ROSA CARAZO BUSTAMANTE . UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA 2019 https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7633764

27- Eficiência de duas técnicas de recuperação de sptzs epididimários de cães e avaliação seminal pós-criopreservação. 2020 **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 72, n. 5, p. 1758-1766, Sept. 2020 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352020000501758&lng=en&nrm=iso>. access on 29 Nov. 2020. Epub Nov 09, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-11020>.

28-UTILIZAÇÃO DE SÍLICA COLOIDAL COMO MÉTODO DE AUXILIO NA SELEÇÃO ESPERMÁTICA PARA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CANINO. HUGO PIEVE DARCADIA. 2017 UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO
https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=6165795

29-USO DA SÍLICA COLOIDAL EQUINA NO PROCESSO DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN CANINO. AMARILDO MARCIANO ROSA. 2018 UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO
https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7472805

30- Diferentes protocolos de congelação de sêmen canino para melhoria de sua cinética e viabilidade / Different canine semen freezing protocols to improve kinetics and viability. Rigoto, Renata Patrícia; Guitolini, Carlos Renato de Freitas; Crespilho, André Maciel; Dell'Aqua, Camila de Paula Freitas; Dell'Aqua Junior, José Antônio; Maziero, Rosiara Rosaria Dias. 2019
<https://pesquisa.bvsalud.org/bvs-vet/resource/pt/vti-26419>

31- Efeito da suplementação na dieta com ômega-3 e -6 sobre a qualidade do sêmen fresco e congelado de cães. Rodrigues, Ana Carolina; Ruiz, Camila Montanari; Nardo, Carla Daniela Dan De; Mothé, Gabriele de Barros; Rossi, Fabiano Martinez; Sousa, Daniel Bartoli de; Atique Netto, Halim; Souza, Fabiana Ferreira de. 2017 <https://pesquisa.bvsalud.org/bvs-vet/resource/pt/vti-25026>

32- BIOMARCADORES DO SÊMEN E DO SANGUE EM CÃES REPRODUTORES SUPLEMENTADOS COM GLUTAMINA E GLUTAMATO. KETTENY MARIA JACQUELLINE DE SOUZA. 2018 https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=6291775

33- Efeito da temperatura de descongelação na integridade de sptzs criopreservados de cães. Moura, C. S; Nunes, A. K. S; Silva, B. S; Peixoto, C. A; Silva, A. R; Silva, S. V; Guerra, M. M. P. Arq. bras. med. vet. zootec; 65(4): 1057-1064, ago. 2013. *ilus, tab*

34- SALINAS, P.; SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN, J.; *Criopreservación de Espermatozoides Caninos a – 80°C. International Journal of Morphology, 31(1), 217–224, 2013. doi:10.4067/s0717-95022013000100036*

35- Validación de SYBR-14 y 6-CFDA para Evaluar la Viabilidad e Integridad de la Membrana Plasmática en Sptzs Caninos de Raza Chihuahua. Salinas, Paulo, Pezo, Felipe, Sánchez, Raúl, & Risopatrón, Jennie 2014. ***International Journal of Morphology***, 32(1), 16-21. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000100003>

36- Effect of hypoosmotic environment on canine semen sperm viability
 Sánchez R, Alfonso, & Zamora D, Patricia. 2016 ***Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú***, 27(2), 288-293. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i2.11649>