

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE DIMETILFORMAMIDA AL DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE ESPERMATOZOIDES FELINOS CONGELADOS-DESCONGELADOS

Bonaura MC^{1,2}, Nuñez Favre R^{1,2}, García Mitacek MC^{1,2}, Tittarelli CM¹, Stornelli MA¹

¹Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, ²CONICET.

Resumen: El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de Dimetilformamida en reemplazo de parte del glicerol a un diluyente Tris base sobre la supervivencia espermática al descongelado en felinos. Se utilizaron 20 gatos, 16 se sometieron a orquiectomía bilateral para realizar la recuperación espermática de los epidídimos, y 4 fueron utilizados para la obtención de semen mediante electroeyaculación. Con los espermatozoides epididimales recuperados y el semen obtenido se realizó criopreservación utilizando un diluyente Tris base con el agregado de 0.5% o 0% de dimetilformamida. El agregado de Dimetilformamida al Tris base no ejerció efectos protectores sobre los espermatozoides congelados-descongelados en comparación con la células criopreservadas con el diluyente Tris base. El agregado de un mayor porcentaje de amida podría mostrar efectos benéficos sobre los espermatozoides felinos al descongelado.

PALABRAS CLAVE: Espermatozoides, gato, semen congelado, criopreservación.

EFFECT OF DIMETHYLFORMAMINE ADDITION IN A TRIS EXTENDER ON VIABILITY OF FROZEN-THAWED CAT SPERMATOZOA

Abstract: The aim of this study was to assess the effect of dimethylformamide in replacement of a glycerol part in a Tris-based extender on viability of frozen-thawed feline sperm. Twenty male cats were included in this study. Sixteen cats were castrated and epididymides were used for spermatozoa recovery. The remaining 4 animals were used for obtained semen by electroejaculation. Cryopreservation with sperm obtained from epididymides and semen were done using a Tris-based extender with 0.5% or 0% of dimethylformamide. The addition of dimethylformamide does not improve sperm parameters compared whit sperm frozen with Tris based extender. The addition of a higher percentage of this amide could show the protector effect on frozen thawed feline sperm.

Keywords: Sperm, cat, frozen semen, cryopreservation

Fecha de recepción: 15/11/13

Fecha de aprobación: 20/02/14

Dirección para correspondencia: Stornelli A, Cátedra y Servicio de Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

E-mail: astornel@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La recuperación de espermatozoides epididimales ofrece un material de gran valor a la hora de conservar material genético de un individuo que ha sufrido muerte súbita o debe someterse a orquiectomía. Esta técnica permite obtener espermatozoides maduros y fértiles que podrán ser criopreservados y almacenados para su posterior uso extendiendo así la vida reproductiva de un individuo, hecho de suma importancia en animales en vías de extinción. Así mismo la criopreservación de espermatozoides y su posterior utilización, mediante inseminación artificial (IA) permite conservar la biodiversidad de las poblaciones y evitar la extinción de algunas especies amenazadas. La IA con espermatozoides criopreservados puede ser útil cuando la hembra y el macho se encuentran en lugares distantes o cuando el macho ya no está disponible para el servicio natural. Esta biotecnología es de gran utilidad en felinos silvestres en vía de extinción (1, 2).

Si bien existen comunicaciones sobre la recuperación y criopreservación de espermatozoides epididimales así como de semen felino (3, 4), son pocos los estudios de la influencia de diferentes crioprotectores incorporados al diluyente (DIL) de congelación sobre la supervivencia de espermatozoides felinos (EF) al descongelado. En la última década, se han realizado algunos estudios del efecto de la adición de detergentes al DIL Tris sobre la criopreservación de semen felino. El uso de Orvus, Equex STM paste y SDS han permitido obtener buenos resultados en el semen congelado-descongelado en esta especie (5, 6, 7, 8).

Los crioprotectores permeables (glicerol, propilenglicol, etilenglicol) permiten remover gran parte del agua intracelular antes del proceso de congelación, evitando de esta manera la formación de cristales de hielo y previniendo de este modo la ruptura celular asociada a este proceso. El glicerol es el crioprotector más comúnmente utilizado en la criopreservación de semen de muchas especies. Sin embargo, puede inducir cambios en los fosfolípidos de membrana alterando la estabilidad y permeabilidad de la misma, evento que puede conducir a una disminución de la longevidad, aceleración de la capacitación y en consecuencia disminución la capacidad fertilizante de los espermatozoides (9). Los efectos tóxicos producidos por el glicerol se relacionan con: 1) alteración directa de las bicapas lipídicas; 2) interacción con las proteínas integrales de membrana y glicoproteínas, 3) inducción del aumento de la demanda bioenergética (10, 11, 12, 13, 14, 15). Asociados al aumento de la viscosidad causado por el glicerol intracelular, puede observarse al Microscopio Electrónico (ME) alteración de los microtúbulos y glicocalyx de la membrana,

desnaturalización de proteínas e inducción de zonas de membrana libres de proteínas (16). La respuesta de la membrana plasmática a cada tipo de crioprotector puede determinar el grado de movimiento de agua y de iones a través de ella (17). La estructura de la bicapa lipídica alterada por el glicerol modificaría las tasas de permeabilidad al agua, afectando así la supervivencia espermática a los procesos de congelación-descongelación (18). El glicerol, además de modificar la estructura nativa de las proteínas de membrana, produce aumento de la osmolalidad en el medio extracelular con el consecuente estrés osmótico sobre la célula espermática y ocurrencia de reacción acrosómica (19). Algunas especies, como los equinos, muestran una mayor sensibilidad a los efectos tóxicos del glicerol, lo que ha impulsado la búsqueda de nuevos crioprotectores.

Las amidas son moléculas de bajo peso molecular y de baja viscosidad por lo que penetran rápidamente las membranas, de esta manera podrían reducir los daños asociados al estrés osmótico (20) generando un ambiente menos dañino para el espermatozoide. Se han observado resultados positivos con el uso de amidas, incorporadas a diluyentes de congelación seminal en conejos, equinos y aves (21, 22, 20, 23). En los equinos, el uso de amidas provee una alternativa para mejorar los parámetros al descongelado de aquellos animales que son definidos como "malos congeladores" (21), sin embargo en los caninos los resultados obtenidos sugieren que no mejorarían la calidad espermática al descongelado (24, 25). Las variaciones observadas, en los estudios realizados, pueden atribuirse a las diferencias existentes en la composición lipídica de las membranas de las distintas especies. La cantidad y tipo de fosfolípidos podría interferir en la estabilidad de la membrana durante la criopreservación (20).

Por lo anteriormente expuesto podemos concluir que hay estudios que muestran que la adición al DIL de amidas en diferentes concentraciones, en reemplazo de parte del glicerol, permite mejorar parámetros de contrastación seminal *in vitro*. Si bien este efecto benéfico ha sido comprobado en equinos y aves (13), no hay estudios que demuestren su acción sobre espermatozoides felinos.

La incorporación al Diluyente Tris base de DMF en reemplazo de parte del glicerol permitiría reducir los efectos tóxicos asociados al glicerol y obtener de esta manera un DIL en el cual se minimicen los efectos tóxicos del crioprotector sobre los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de DMF al DIL TRIS sobre la supervivencia espermática al descongelado en felinos. La hipótesis planteada fue que la incorporación al DIL TRIS de DMF permitirá reducir

los efectos tóxicos del glicerol sobre los espermatozoides epididimales y seminales durante el proceso de congelación-descongelación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de cumplir con el objetivo planteado se diseñaron dos experimentos.

Experimento I:

Se utilizaron gatos (n=16) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual en un diseño aleatorio (26). Los gatos utilizados fueron incluidos en un plan de control urbano de la reproducción. Luego de la orquiectomía bilateral (27), los testículos y epidídimos (EPI) de cada animal se colocaron inmediatamente en solución fisiológica (SF) con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, mantenidos a temperatura ambiente y enviados rápidamente al laboratorio.

Los EPI fueron procesados dentro de las 4 hs posteriores a la orquiectomía, tiempo que se tarda desde la orquiectomía hasta la llegada de los órganos al laboratorio. Se separaron las colas de los epidídimos y se atemperaron en un baño termostático a 37 °C por 10 minutos en 0,75 ml de Tris base (Tris 3,025 g, ácido cítrico 1,27 g, fructosa 1,25 g, agua destilada csp 100 ml). La recuperación de los espermatozoides epididimales (EE) se realizó por cutting de la cola del epidídimo (28).

Pruebas de contrastación del material seminal *in vitro*:

Los EE obtenidos en Tris base fueron colocados en un baño termostático a 37°C y sometidos a las siguientes pruebas de contrastación:

Examen macroscópico: 1) Color; 2) Aspecto; 3) Volumen (ml).

Examen microscópico: 1) Concentración espermática (CE; 10^6 /ml), se calculó realizando el conteo en cámara de Neubauer(29); 2) Motilidad individual (MI), una muestra de 10 μ l de los EE frescos se colocaron en un portaobjetos limpio a 37 °C, se le colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X, en varios campos se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (5, 29); 3) Vigor (VI, escala 1-5) 10 μ l de los EE frescos se colocaron en un portaobjetos limpio a 37 °C, se le colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X, en varios campos se estimó el tipo de movimiento individual (5, 29); 4) Morfología espermática (ME; % anomalías primarias y secundarias), se observaron los espermatozoides por microscopía a 1000 X utilizando tinción 15 Biopur (29); 5) Acrosomas intactos (AI, % de acrosomas intactos), una muestra de los EE se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de *Pisum sativum* aglutinin-isotiocianato de fluoresceína (30); 6) Integridad de mem-

brana (IM, porcentaje membranas intactas), una muestra de los EE se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) y Yoduro de propideo (YP) (31).

Para realizar la congelación de los EE se utilizaron dos diluyentes DIL (n=2) diferentes. Los EE recuperados se mezclaron con un volumen calculado de cada uno de los DIL descriptos para obtener una concentración final de 50 x10⁶ espermatozoides/ml. Se utilizó un DIL TRIS con 5 % de glicerol sin el agregado de Dimetilformamida (DMF; [TRIS0]) o con el agregado de, 0.5% de DMF y 3,5 % de glicerol [TRISDMF]. El DIL TRIS que se utilizó tenía la siguiente composición: Tris (2,4 g), ácido cítrico (1,4 g), fructosa (0,6 g), glicerol (4 g), yema de huevo (20 % v/v), penicilina sódica (0,06 g), sulfato de estreptomina (0,1 g), y agua destilada (cantidad suficiente para [csp] 100 ml) (32). Luego de un tiempo de equilibración de 20 minutos a 4 °C (33), los EE diluidos fueron envasados en pajuelas de 0,25 ml y congelados de acuerdo a la técnica descrita por Andersen (32). La descongelación de los EE se realizó a 37 °C durante 15 segundos (7).

Los EE congelados-descongelados fueron sometidos a las mismas pruebas de contrastación microscópica que los EE frescos.

Experimento II:

Se utilizaron gatos (n=4) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual en un diseño aleatorio (26). Los gatos fueron alojados en una habitación acondicionada, en jaulas individuales, alimentados con alimento balanceado (Fit 32[®], Royal Canin, Argentina) y agua *ad-libitum*. Los animales se encontraban sometidos a un régimen de luz artificial de fotoperíodo largo (14 horas luz diarias), con lámparas incandescentes de 100 W (34), a fin de mantener estable la producción espermática (35). Luego de permanecer 45 días en este régimen de luz, los gatos fueron anestesiados con ketamina (25 mg/kg i.m.), xylazina (1 mg/kg i.m.) y atropina (0,04 mg/kg i.m.) (36) y sometidos cada 15 días a electroeyaculación para obtención de un eyaculado (35). Se obtuvieron dos eyaculados por animal.

El semen obtenido fue congelado con los diluyentes y la metodología descrita en el experimento I. Los espermatozoides (E) frescos y los congelados-descongelados fueron sometidos a las mismas pruebas de contrastación descriptas en el Experimento I.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA. Las variables categóricas se analizaron con PROC CATMOD y las continuas con PROC GLM de SAS[®] (37).

Marco bioético del uso de animales

Los experimentos se realizaron respetando y de acuerdo con las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y con las recomendaciones de la National Academy Science, Washinton DC, USA. Estas recomendaciones serán tenidas en cuenta en lo referente a la atención médico veterinaria, medio ambiente, alimentación, sanidad, identificación, sujeción, administración de drogas, toma de muestras sangre y procedimientos quirúrgicos (38).

RESULTADOS

En el experimento I se observaron diferencias significativas en MI, VI, IM entre los EE pos obtención y los EE congelados-descongelados ($57,5\pm 3,08$ vs $7,5\pm 1,88$; $4,75\pm 0,15$ vs $4\pm 0,2$; $66,5\pm 2,77$ vs $8,5\pm 1,82$; $p < 0.001$). Los EE congelados-descongelados con TRISDMF no mostraron diferencias significativas en ninguno de sus parámetros cuando se los comparó con los valores obtenidos en los EE congelados descongelados con TRISO.

En el experimento II se observaron diferencias significativas en MI, VI, IM, IA entre los E frescos y los E congelados-descongelados ($91,66\pm 0,8$ vs $16,94\pm 2$; $4,94\pm 0,05$ vs $3,47\pm 0,16$; $76,77\pm 4,17$ vs $10,2\pm 2,33$; $71,33\pm 3,74$ vs $32\pm 2,93$; $p < 0.001$). Los E congelados-descongelados con TRISDMF no mostraron diferencias significativas en ninguno de sus parámetros cuando se los comparó con los valores obtenidos en los E congelados-descongelados con TRISO.

DISCUSIÓN

En este trabajo puede observarse que los EE y los E eyaculados felinos responden de igual forma al proceso de congelación-descongelación al utilizar un DIL TRISO o TRISDMF. Estos hallazgos concuerdan con lo observado por Tebet 2006 y Hermanson 2007, quienes no encontraron diferencias en los EE y los E eyaculados felinos congelados-descongelados con Tris (39, 40).

Nuestros resultados muestran que en contraposición con lo planteado en la hipótesis el agregado de 0,5% de DMF en reemplazo del glicerol no mejora la supervivencia espermática al descongelado. Nuestros hallazgos concuerdan con lo observado en caninos (41, 25). En contraposición con lo observado en nuestro trabajo en equinos y en aves (21, 13, 22, 42) se observó un efecto benéfico de la DMF sobre la supervivencia espermática al descongelado. Lo expuesto podría deberse a las diferencias encontradas en la composición lipídica de la membrana espermática en las diferentes especies (20).

Debido a que los efectos de los crioprotectores son especie-específicos (43, 44, 45), es

posible que los espermatozoides felinos requieran el reemplazo de un mayor porcentaje de glicerol por amidas para evidenciar los efectos benéficos del agregado de DMF al descongelado. Sin embargo la concentración de glicerol óptima para la supervivencia de los espermatozoides descongelados depende de varios factores, y puede ser influenciada por otros componentes del diluyente, por las tasas de enfriado y método de congelación-descongelación. Es así que estos factores también podrían influir en nuestros resultados y deben ser considerados en futuros experimentos.

Estudios donde se varíe la concentración y/o tipo de amida, son necesarios para determinar si las amidas mejoran la supervivencia espermática al descongelado en los felinos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Curry MR. Criopreservation on mammalian semen. *Methods Mol Biol.* 2007; 368: 303-311
2. Howard JG. Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores. In: Fowler ME, Miller RE, editors. *Zoo and wild animal medicine IV.* Philadelphia, PA: WB Saunders Co.; 1999; p 449-57.
3. Hay MA, Goodrowe KL. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J Reprod Fert, Suppl* 1993; 47:297-305.
4. Pushett DA, Lacham-Kapln O, Gunn IM, Trounson AO. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using epididymal sperm and in vitro -matured oocytes in domestic cat: A model for endangered species. *Theorogenology* 2000; 53:400 (abstract).
5. Axner E, Linde-Fosberg C. Mating and artificial insemination in Small animal reproduction and neonatology (eds) G. Simpson, G. C. England and M. Harvey, Cheltenham: BSAVA. 1998; pp. 105-111.
6. Bonaura MC, Praderio R, Tittarelli MC, Nuñez Favre R, Stornelli MA. Efecto de la adición de Dodecil Sulfato de Sodio a un diluyente Tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales post descongelación. XIII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, FCV - UNR. Segunda Reunión Conjunta UNL - UNR.2012.
7. Chatdarong Thuwanut P, Manee-In S, Lohachit C, Axner E. Effects of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2008.
8. Mizutani T, Sumigama S, Nagakubo K, et al. Usefulness of addition of Orvus ES paste and sodium lauryl sulfate to frozen feline semen. *J Vet Med Sci.* 2010; 72(1):23-7.
9. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7:871-91
10. Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiol* 1987; 24:324-331.

11. Armitage WJ. Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets. *Cryobiol* 1986; 23:116-125.
12. Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurell Wistram C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J* 1987; 242:1-10.
13. Gomes GM, Jacob JCF, Medeiros ASL, Papa FO, Alvarenga MA. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology* 2002; 58:277-9.
14. Hammerstedt RH, Grahan JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 1990; 11:73-88.
15. Hempling HG, White S. Permeability of cultured megakaryocytopoietic cells of the rat to dimethylsulfoxide. *Cryobiol* 1984; 21:133-143.
16. Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29, 26-38.
17. Neidermeyer W, Parish CR, Moor H. Reactions of yeast cells to glycerol treatment. Alterations to membrane structure and glycerol uptake. *Protoplasma* 1977; 92:177-193.
18. Boggs JM, Rangaraj G. Phase transitions and fatty acid spin label behavior in interdigitated lipid phases induced by glycerol and polymyxin. *Biochim Biophys Acta* 1955; 816:221-233.
19. Aitken RJ, Wang YF, Liu J, Best F, Richardson DW. The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int J Androl.* 1983; 6 2:180-93.
20. Lopes KRF, Costa LLM, Lima GL, Souza ALP, Silva, AR. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 2009; 72:650-654.
21. Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci* 2005; 89:105-113.
22. Kashiwazaki N, Okuda Y, Seita Y. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and Dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. *J Reproduction Develop* 2006; 52:511-6.
23. Medeiros ASL, Gomes GM, Jacob JCF, Carmo MT, Papa FO, Alvarenga MA. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 2002; 58:273-269.
24. Dalimata AM, Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. *Theriogenology* 1997; 49:831-41.
25. Savignone CA, Gimenez F, Nuñez Favre, R, et al. Comparison of different concentrations of dimethylformamide on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. 17th Brazilian Congress of Animal Reproduction Curitiva. Brasil 13 de mayo, 1 y 2 de junio de 2007. *Anales del congreso* pp175.
26. Petersen RG. Design and analysis of experiments. Marcel Dekker Inc. New York. 1985 p. 314.
27. Slatter D. Textbook of small animal surgery. In: Saunders W, editor. 2° ed. Philadelphia; 1993; 1325-1335.
28. Tittarelli CM, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli, MA, de la Sota RL. Effect of transport media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology.* 2006; 66: 1637-1640.
29. Johnston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. Canine and feline *Theriogenology.* WB Saunders. Philadelphia 2001; 287-306.
30. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tsarik J. Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J. Reprod. Fertil.* 1992; 95:755-763.
31. Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1990; 88:343-52.
32. Villaverde IA, Melo CM, Martin C, et al. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*). *Artificial insemination in domestic cats.* *Anim Reprod Sci.* 2008, 21.
33. Luvoni CG. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 2006; 66:101-111.
34. Giménez F, Stornelli MC, Tittarelli C, et al. Effect of melatonin implants on control of reproduction in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology,* 2006; 66: 681-682.
35. Stornelli MA. Basic and advanced evaluation of cat's semen. *Brazilian journal of animal reproduction,* 31(1), January/March 2007; p 135-140
36. Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, et al RL. Seasonal changes in testis cell morphology in male domestic cats (*Felis catus*). 6 Simposio internacional de Reproducción de caninos y felinos. Viena, Austria EVSSAR. 2008; 246-248.
37. SAS/STAT., S., User's Guide. Version 6, 4th Edition. SAS Inst. Inc. Cary, NC. 1989; p. 1684.
38. CIOMS. Council for International Organizations of Medical Sciences. International guiding principles for biomedical research involving animals. 1985
39. Hermansson U, Axner E. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4 °C. *Theriogenology* 2007; 67:1239-1248.
40. Tebet JM, Martins M.I.M, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology* 2006; 66:1629-1632.
41. Filho AC, Teles CHA, Jucá RP, et al. Dimethylformamide as cryoprotectant of canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology* 2011; 76:1367-1372.
42. Medeiros ASL, Gomes GM, Jacob JCF, Carmo MT, Papa FO, Alvarenga MA. Cryopreservation of stallion

sperm using different amides. *Theriogenology* 2002; 58:273-769.

43. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000; 53: 47-58

44. Peña A, Linde-Forsberg C. Effects of Equex, one- or two step dilution, and two freezing and thawing rates on postthaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2000; 54: 859-875.

45. Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 2006; 65: 1848-1858.