



CENTRO UNIVERSITÁRIO PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS - UNIPAC

Amanda de Oliveira Pierazoli

BIOTECNOLOGIAS APLICADAS À REPRODUÇÃO NA ESPÉCIE CANINA: revisão de literatura

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Banca
Examinadora do Centro
Universitário Presidente Antônio
Carlos, como exigência parcial
para obtenção do título de
Bacharel em Medicina
Veterinária.

Juiz de Fora
2023



CENTRO UNIVERSITÁRIO PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS - UNIPAC

Amanda de Oliveira Pierazoli

BIOTECNOLOGIAS APLICADAS À REPRODUÇÃO NA ESPÉCIE CANINA: revisão de literatura

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Banca
Examinadora do Centro
Universitário Presidente Antônio
Carlos, como exigência parcial
para obtenção do título de
Bacharel em Medicina
Veterinária.

Orientador: Dr. Leonardo Toshio
Oshio

Juiz de Fora
2023

AMANDA DE OLIVEIRA PIERAZOLI

**BIOTECNOLOGIAS APLICADAS À REPRODUÇÃO NA ESPÉCIE
CANINA: revisão de literatura**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo Toshio Oshio
Prof^ª. Me. Anna Marcella Neves Dias
M.V. Esp. Carmen Elisa Teixeira Makla

BIOTECNOLOGIAS APLICADAS À REPRODUÇÃO NA ESPÉCIE CANINA: revisão de literatura

BIOTECHNOLOGIES APPLIED TO REPRODUCTION IN THE CANINE SPECIES: review

AMANDA DE OLIVEIRA PIERAZOLI¹, LEONARDO TOSHIO OSHIO²

Resumo

Introdução: A biotecnologia reprodutiva dos cães, tem sido um método de escolha para os profissionais que prezam pelo melhoramento genético e que tem potencializado a reprodução dos cães. Esta técnica tem vários privilégios que serão relatados ao longo deste trabalho. Vale ressaltar sobre a importância de ter conhecimento da morfofisiologia reprodutiva dos cães. Além das técnicas de coleta e criopreservação dos espermatozoides que também podem influenciar no processo reprodutivo. **Objetivo:** Revisar sobre a importância de biotecnologias aplicadas à reprodução na espécie canina, a praticidade e aplicabilidade das diferentes biotecnologias, os meios da coleta e criopreservação do sêmen e as técnicas e métodos da inseminação artificial. **Métodos:** O trabalho foi realizado por meio de revisão de literatura, através de bancos eletrônicos como Google Acadêmico, Pubmed, Bireme, Scielo, Pubvet, livros de língua portuguesa e inglesa, no período de 2001 a 2022. **Revisão de Literatura:** Para ter bons resultados na inseminação artificial deve-se ter o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva da fêmea e do macho, o qual permite melhor resultado na fecundação, entender sobre o ciclo estral e seus métodos de identificação, pois a ovulação das fêmeas pode variar. Importante salientar, sobre os meios de coleta e criopreservação do material genético que deverá ter a antisepsia adequada sendo de suma importância para evitar infecções. Abordar os métodos de inseminação, destacando suas vantagens, visto que todos esses fatores podem influenciar no processo reprodutivo. **Considerações Finais:** A reprodução canina é um campo complexo e variado, onde diversas técnicas e abordagens podem ser aplicadas com o objetivo de melhorar a qualidade genética, preservar linhagens valiosas e garantir a saúde e o bem-estar dos cães. As biotecnologias aplicadas na reprodução, como a maturação *in vitro*, a fertilização *in vitro* e a transferência de embriões, oferecem vantagens significativas em relação à reprodução natural, permitindo maior controle e otimização dos processos reprodutivos.

Descritores: Inseminação artificial em cães, reprodução dos cães, fisiologia reprodutiva dos cães, biotecnologia reprodutiva dos cães.

¹ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Presidente Antônio Carlos -UNIPAC – Juiz de Fora - MG

² Médico Veterinário, Professor do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, doutor.

Abstract

Introduction: The reproductive biotechnology of dogs has been a method of choice for professionals who value the genetic improvement and has enhanced the reproduction of dogs. This technique has several privileges that will be reported throughout this work. It is worth mentioning the importance of having knowledge of the reproductive morphophysiology of dogs. Besides the techniques of collection and cryopreservation of spermatozoa that can also influence the reproductive process. **Objective:** To review the importance of biotechnologies applied to reproduction in the canine species, the practicality and applicability of different biotechnologies, the means of semen collection and cryopreservation and the techniques and methods of artificial insemination. **Methods:** This study was carried out by means of a literature review, through electronic databases such as Google Scholar, Pubmed, Bireme, Scielo, Pubvet, Portuguese and English language books, in the period from 2001 to 2022. **Literature Review:** To have good results in artificial insemination it is necessary to have knowledge about the reproductive physiology of the female and the male, which allows better results in fecundation, to understand the estrous cycle and its identification methods, since the ovulation of females may vary. It is important to emphasize the means of collection and cryopreservation of genetic material, which should have the appropriate antisepsis, being of utmost importance to avoid infections. Address the methods of insemination, highlighting their advantages, since all these factors can influence the reproductive process. **Final Considerations:** Canine reproduction is a complex and varied field, where several techniques and approaches can be applied in order to improve genetic quality, preserve valuable bloodlines and ensure the health and welfare of dogs. Biotechnologies applied to reproduction, such as in vitro maturation, in vitro fertilization and embryo transfer, offer significant advantages over natural reproduction, allowing greater control and optimization of reproductive processes.

Descriptors: Artificial insemination in dogs, dog reproduction, dog reproductive physiology, dog reproductive biotechnology.

INTRODUÇÃO

A reprodução de pequenos animais em comparação às demais áreas da Medicina Veterinária, sempre foi olhada com desleixo, mas desencadeou interesses em pesquisadores, após criadores profissionais relatarem problemas reprodutivos nas fêmeas.^{1,2} É importante salientar que os profissionais que trabalham com o melhoramento canino, tem buscado serviços de qualidade e produtos que potencializam a reprodução dos cães. Sabe-se que os métodos de transporte de animais são inviáveis financeiramente no Brasil devido ao alto custo cobrado pelo peso da caixa de transporte, com isso, o melhor método é a inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado ou congelado. Esse método tem o intuito de reduzir os custos, a possibilidade da instalação do banco de

sêmen para armazenagem do material genético coletado de bons reprodutores, incluindo os que já morreram.^{3,4}

A espécie canina apresenta uma ampla diversidade de raças, cada uma com suas particularidades genéticas. A biotecnologia reprodutiva tem sido utilizada para auxiliar na seleção de características desejáveis, como temperamento, aparência e habilidades físicas, além de contribuir para o tratamento de problemas reprodutivos e genéticos. Nesse contexto, técnicas como a inseminação artificial (IA), a maturação *in vitro* (MIV) a fertilização *in vitro* (FIV) e a criopreservação de sêmen e embriões, têm sido amplamente exploradas.^{5,6} Essas técnicas têm o objetivo de prevenir contra doenças sexualmente transmissíveis, redução dos casos de consanguinidade e taxas hereditárias, contribui no caso dos machos com dificuldade de realizar a monta natural e possibilita a potencialização do sêmen de um reprodutor de excelência em várias fêmeas. O que resulta na permanência e preservação de um material genético com alto valor efetivo.^{3,6}

Dentre as tecnologias, a IA na espécie canina foi relatada como um marco histórico pelo investigador Lázaro Spallanzani que, em 1780, realizou sua primeira vez. Ele cumpriu todos os métodos adequados, incluindo o aquecimento dos instrumentos à temperatura corporal para não prejudicar a vitalidade espermática. Pelo processo de masturbação ele coletou os sêmens de um cão e inseminou uma cadela, e obteve sucesso com três filhotes vivos e normais.^{1,3,7}

Em consideração aos machos, a coleta dos espermatozoides epididimários é outra técnica que está em desenvolvimento e de importante valia, porque permite adquirir materiais genéticos de animais que vieram a óbito, que possuem afecções que o impossibilite de realizar a monta ou aqueles que não têm capacidade fecundante. A viabilidade espermática é importante na criopreservação dos sêmens, pois se houver estresse durante esse processo de coleta, ocasionará alterações espermáticas.⁸⁻¹⁰

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo revisar sobre a importância de biotecnologias aplicadas à reprodução na espécie canina.

MÉTODOS

Este trabalho foi realizado por meio de revisão de literatura e busca de artigos dos bancos eletrônicos tais quais Pubmed, Bireme, Scielo, Google Acadêmico e em endereços eletrônicos governamentais. Além disso, foi realizada consulta em livros didáticos e publicações impressas periódicas. Foram selecionados trabalhos de literatura médico veterinária em línguas inglesa e portuguesa, publicados no período de 2001 a 2022.

REVISÃO DE LITERATURA

Para entender melhor os métodos de biotecnologia, é importante entender como funciona o sistema reprodutivo das cadelas e dos cães. A puberdade das fêmeas pode ocorrer entre o 6^o e 24^o mês de vida. Seu ciclo estral compreende-se por três fases: o pró-estro que tem sangramento, desperta a libido do macho, mas ainda não está receptiva à monta; o estro, que é caracterizado quando ela fica receptiva; o diestro, que é o período de repouso entre os ciclos estrais; e o anestro, caracterizado pelo período de inatividade sexual. A cadela pode ovular dias antes ou após o estro. Em alguns casos, por não demonstrar o cio, pode ser despercebido, o que enfatiza a necessidade de monitorar o ciclo. Este, pode ser por meio da vaginoscopia, citologia vaginal, dosagem hormonal (progesterona plasmática). Portanto, recomenda-se realizar as dosagens no início e fim do metaestro que é definido pelo momento da instalação do corpo lúteo. Nas cadelas, o metaestro não possui essa definição, visto que é uma espécie que apresenta uma luteinização precoce ainda na fase de folículo pré-ovulatório.¹¹⁻¹⁷

Outros exames complementares para os cães que serão submetidos às tecnologias de reprodução, são a sorologia para brucelose, cultura e antibiograma de secreção vaginal.¹⁸

A técnica de coleta dos oócitos é importante para ter êxito nas biotécnicas da reprodução que englobam a produção *in vitro* de embriões. Ela pode ser realizada por duas metodologias, a punção (PUN) folicular e/ou fatiamento (FAT) do ovário, considerada a mais utilizada. Vale ressaltar que a idade das cadelas pode influenciar na quantidade e qualidade dos oócitos coletados. Outro método de coleta dos oócitos é por via laparotomia, porém é uma técnica mais invasiva, que faz perfusão uterina sem a excisão do útero, sendo importante realizar entre 10^o e 11^o dia após a ovulação.¹⁵⁻¹⁷

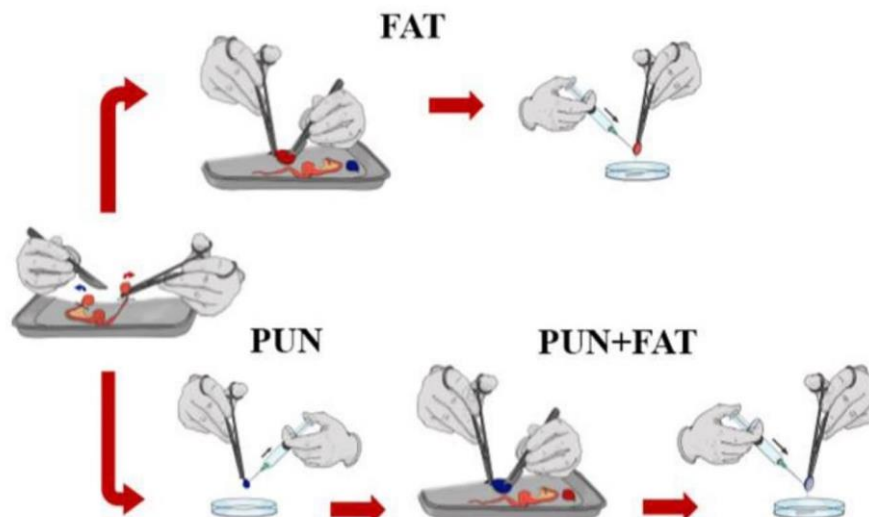


Figura 1 - Esquema representativo dos grupos experimentais demonstrando as diferentes técnicas de recuperação dos oócitos na fase folicular, sendo PUN (punção dos folículos), PUN+FAT (fatiamento dos ovários que foram anteriormente punçoados) e FAT (somente fatiamento do outro ovário). Esta técnica foi aplicada para gatas e cadelas.

Fonte: Cunha et al.¹⁸

Nos machos, há um tipo celular, que é a célula de Leydig, responsável por produzir testosterona, controlada pelo hormônio luteinizante (LH). A testosterona é o hormônio responsável pelo desenvolvimento e manutenção da libido, que desencadeia mudanças comportamentais como a marcação de território. Portanto, é importante realizar exames clínicos e andrológicos para avaliar a estrutura dos testículos. Vale ressaltar que os cães não possuem a glândula bulbouretral nem a vesícula seminal, que é responsável pela formação do plasma seminal, com a finalidade de nutrir e diminuir o excesso de acidez do trato genital da cadela, facilitando o transporte dos espermatozoides.^{19,20}

Os fatores como a técnica de coleta do material espermático podem influenciar na viabilidade espermática, a combinação do diluente, o processamento do sêmen, o método de congelamento e descongelamento durante a criopreservação. O ejaculado canino é composto por três frações distintas: a de origem prostática, de origem testicular, de origem prostática, como pode visualizar na imagem abaixo.¹⁸⁻²²

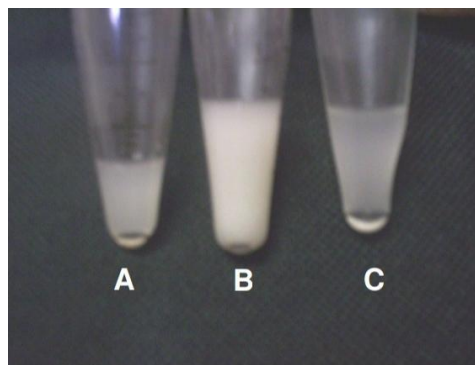


Figura 2 - As frações do ejaculado canino. **A:** 1ª fração ou fração prostática. **B:** 2ª fração ou fração espermática. **C:** 3ª fração ou fração prostática.

Fonte: Uchoa et al.²¹

As formas de coleta dos sêmens podem ser: pela vagina artificial, manipulação digital e a eletroejaculação. Existe uma técnica que ainda vem sendo estudada que não precisa da ejaculação, que é a coleta dos espermatozoides epididimários. A flutuação é uma técnica cuja função é fatar a cauda do epidídimo, deixar em um diluidor e esperar que os espermatozoides migrem para o meio. Outro método é o fluxo retrógrado, que realiza um corte na junção do corpo do epidídimo onde sairá o líquido seminal, após, deve-se realizar uma pressão nos vasos deferentes. É possível realizar esses processos após a cirurgia de orquiectomia. Contudo, o sêmen obtido não terá resistência e haverá danos às células espermáticas na criopreservação.^{3,20}



Figura 3 - Coleta de sêmen na espécie canina. **A:** Manipulação peniana através do prepúcio. **B:** Início da ereção peniana. **C:** Pênis com irrigação sanguínea e ereção moderada **D:** Pênis com irrigação sanguínea e ereção completa. **E:** Gotejamento da fração espermática em tubo graduado.

Fonte: Uchoa et al.²¹

A criopreservação é um método de conservação dos espermatozoides com a finalidade de proporcionar a interação da membrana celular e gerar estabilização. Para não prejudicar a vitalidade espermática deve-se garantir que a água esteja em um ponto adequado. Os crioprotetores mais empregados na reprodução canina, são o etilenoglicol e dimetilformamida. Diluidores mais utilizados, como o Tris, solução salina fisiológica, leite desnatado, base de glicina-gema (gema de ovo), a base de água de coco.²³⁻³¹.

A Inseminação Artificial (IA) é uma técnica antiga com o intuito de promover o melhoramento genético, ajudar nos casos de animais com dificuldades de realizar a monta natural e prevenir contra doenças sexualmente transmissíveis. A inseminação pode ser realizada por transferência de embriões e fertilização *in vitro*, o que possibilita ter descendentes de animais que já morreram. Existem duas formas de realizar a inseminação artificial sendo por via intravaginal IV (depositado direto na vagina) ou via intrauterina (no útero). Na inseminação artificial intravaginal (IAIV) deve-se depositar o sêmen ao longo da vagina com o auxílio de uma sonda rígida de plástico, ou a sonda Osiris. É necessário elevar e apoiar os membros pélvicos por 15 minutos para ter eficácia (Figura 4).^{1,19}

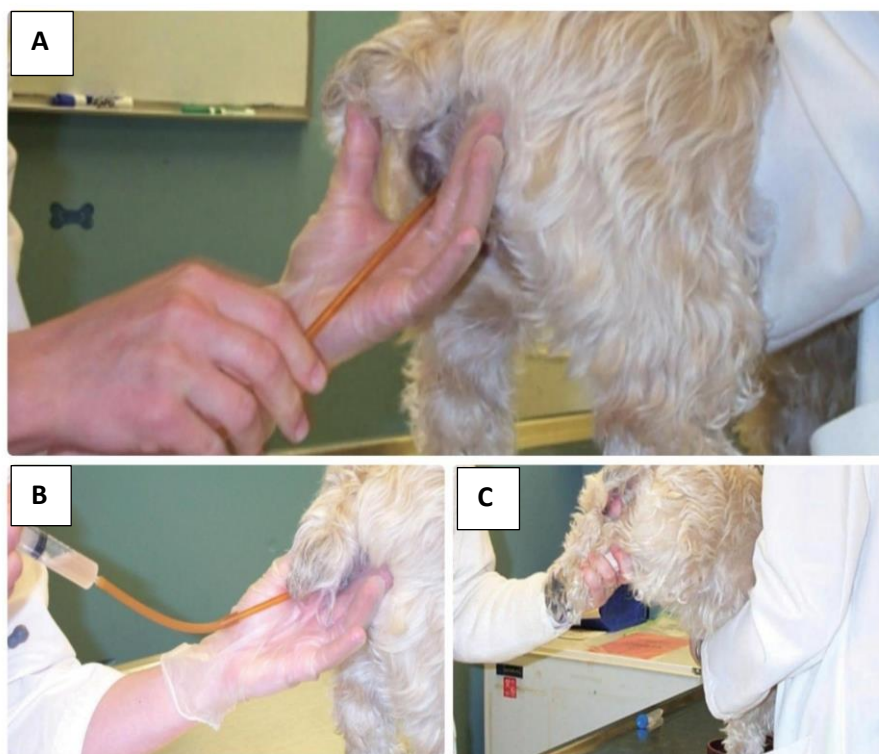


Figura 4 - A: Passagem da pipeta sobre o dedo enluvado na vagina da cadela. **B:** Introdução de sêmen. **C:** Técnica "Carrinho de mão" elevação dos membros pélvicos da cadela.

Fonte: Kustritz⁸

A inseminação artificial por via intrauterina (IAIU) é um método mais reservado que consiste na deposição do sêmen dentro do útero da cadela por via transcervical e com isso, deve-se ter habilidade e conhecimento da anatomia da cérvix, mas essa técnica não é vantajosa, porque causa desconforto para a fêmea. A IAIU por laparotomia não é uma opção conveniente, visto que se trata de uma intervenção cirúrgica com todos os riscos contidos. A IAIU por laparoscopia também é uma técnica cirúrgica de ligeira execução, pouco invasiva, e consiste na deposição dos sêmens em um dos cornos uterinos, onde o mesmo migra para o outro corno.²¹⁻²⁴

A maturação *in vitro* (MIV), é primordial, pois antecede a fecundação, a produção e o desenvolvimento *in vitro* de embriões. Nos canídeos o processo de meiose ocorre após o processo de mitose, nas primeiras semanas subsequentes. A divisão celular mitótica e meiótica consiste em quatro etapas: prófase (leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese), metáfase, anáfase e telófase. É na fase diplóteno da prófase I que os canídeos concedem os oócitos ainda imaturos, em condição de vesícula germinativa (VG), para o

interior do oviduto sendo necessário esperar de 54 a 72 horas para que exerça o estágio de metáfase II e adquira a aptidão para sucederem a fecundação. Para que o oócito seja fecundado e passe pela fase inicial do desenvolvimento embrionário são necessárias alterações moleculares e morfológicas. Essa técnica oferece diversos benefícios como o aumento do número de oócitos utilizáveis, controle do tempo de maturação, possibilidade de superar problemas de fertilidade, preservação genética e redução do risco de doenças transmitidas pela reprodução natural.^{4,32-35}

A transferência de embriões *in vitro* (TE), é uma técnica que ainda tem sido estudada por não ter uma relevância no desenvolvimento embrionário *in vitro* por conta da sua fisiologia reprodutiva. Esta técnica abrange as etapas de sincronização do estro, monta natural, inseminação artificial, colheita de oócitos e maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e a inoculação dos embriões nas receptoras. Para realizar a coleta dos embriões, a tuba uterina deverá ser lavada até o 9º dia pós-ovulação para se obter embriões até o estágio de mórula ou lavar o corpo uterino após o 10-11º dia nos quais se encontrará tanto mórula como blastocisto, ambas lavagens são procedimentos cirúrgicos. É necessário ter sincronização entre a doadora e receptora, a qual deve estar em condições endócrinas necessárias para que ocorra o crescimento embrionário. Após a produção dos embriões *in vivo* ou *in vitro* eles serão transferidos para a receptora. Se por acaso seu ciclo natural não estiver acompanhando a evolução do pró-estro ao estro, ela poderá ser superestimulada com hormônios e após será realizado a inseminação. Através da TE é possível aumentar a taxa de concepção, utilizar fêmeas com problemas reprodutivos, fazer a preservação genética e multiplicação de indivíduos valiosos, produzir filhotes em larga escala, prevenir doenças hereditárias, controlar o intervalo entre as gestações, transportar os embriões a longas distâncias.^{5,35}

A fertilização *in vitro* (FIV), é indicada nos casos de ambiente uterino alterado, capacitação espermática inadequada, obstrução de oviduto, oligozoospermia e infertilidade de origem desconhecida. Diferente da transferência de embriões (TE), a fertilização é uma biotecnologia que ocorre fora do útero, ou seja, todo o processo de maturação folicular, fertilização e desenvolvimento embrionário ocorre no laboratório *in vitro*. Esse método inicia-se com uma estimulação ovariana controlada, para que ocorra a produção de

oócitos. Vale ressaltar que cada oócito deve receber em média de 50 a 100 mil espermatozoides móveis e sadios. Após esse processo, ocorre a produção de embriões *in vitro*, onde os oócitos são coletados com o auxílio de ultrassonografia transvaginal e levados para o laboratório. Se formar pré-embriões, esses serão transferidos para o útero após 48 a 120 horas da coleta. Com apenas uma dose de sêmen, é possível disponibilizar para várias doadoras sem o uso de hormônios (superovulação). Para cada 10 embriões transferidos para as receptoras apenas 40% chegam até o fim da gestação. Controle preciso do processo de fertilização: Com a FIV, é possível controlar e monitorar todo o processo de fertilização em um ambiente controlado em laboratório. Isso permite a manipulação cuidadosa dos gametas (oócitos e espermatozoides), melhorando as chances de sucesso da fertilização. Essa técnica permite superar problemas de infertilidade, permite a seleção e a fertilização de oócitos com espermatozoides de alta qualidade em condições favoráveis. aumento das chances de sucesso, preservação genética e reprodução seletiva, diagnóstico genético pré-implantação e maximização do potencial reprodutivo.^{2,36-38}

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considera-se que a biotecnologia aplicada na reprodução dos cães vem sendo estudada e melhorada com as novas tecnologias que abrangem métodos inovadores, além da importância de se ter o conhecimento da fisiologia reprodutiva dos cães para que tenha sucesso nos procedimentos. Os criadores responsáveis que buscam melhoramento genético e prevenção de doenças sexualmente transmissíveis como, o TVT (Tumor venéreo transmissível), tem despertado interesse nessas novas metodologias, vale frisar que para a realização desta técnica é importante que seja efetuada por um profissional capacitado, ou seja, um médico veterinário especializado para exercer tal função, evitando assim problemas futuros.

REFERÊNCIAS

1. Montanha FP, Demori MVA. Inseminação Artificial em Cães – Revisão. Rev Cient Eletrôn Med Vet [periódico na internet]. 2013; [citado 2022 ago 7]; 20: [cerca de 7p.]. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/sagA3MlvvQfGD2c_2013-6-21-16-3-55.pdf

2. Cunha GN, Jacomini JO, Beletti ME. Taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial em fêmeas caninas (*Canis familiaris*-Linnaeus, 1758). Biotemas [periódico na internet]. 2005; [citado 2022 ago 7]; 18 (2): [cerca de 11p.]. Disponível em:
<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/21422/19385>
3. Uchoa DC, da Silva TFP, Mota Filho AC, da Silva LDM. Criopreservação de Sêmen e Inseminação Artificial em Cães. *Ciênc Anim.* 2012; 22 (1):132-142
4. Apparício M, Mostachio GQ, Motheo TF, Padilha L, Alves AE, Pires-Butler EA, et al. Maturação in vitro de oócitos caninos. *Rev Bras Reprod Anim.* 2011; 35 (1):16-25
5. Apparício M, Vicente WRR. Desenvolvimento embrionário e transferência de embriões em cadelas. *Rev Bras Reprod Anim.* 2015; 39 (1):146-149
6. Gobello C, Corrada Y. Biotechnology in Canine Reproduction: An Update. *Analec Vet.* 2003; 23 (1):30-37
7. Linde-Forsberg C. Biology of reproduction of the dog and modern reproductive technology. [texto na internet]. 2007; [citado 2022 Ago 4]; [cerca de 17p.]. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/255573604_Biology_of_Reproduction_of_the_Dog_and_Modern_Reproductive_Technology
8. Kustritz MVR. Clinical Canine and Feline Reproduction Evidence-Based Answers. Iowa: Wiley-Blackwell; 2009.
9. Angrimani DSR, Lúcio CF, Veiga GAL, Regazzi FM, Silva LCG, Nichi M, et al. Biotécnicas reprodutivas com o emprego de espermatozoides epididimários em cães. *Rev Bras Reprod Anim.* 2013; 37 (4):323-327
10. Lucio CF, Angrimani DSR, Brito MM, Vannucchi CI. Oxidative Stress Challenges During The Sperm Cryopreservation in Dogs. *J Vet Androl.* 2017 2 (1):1-7
11. Fonseca CW. Sistema Reprodutor Feminino [texto na internet] Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Pelotas - UFPel - Campus Porto; S.D. [Citado 2023 Fev 10]. Disponível em:
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwj6zcrfk-b8AhULq5UCHXK2DXsQFnoECA8QAQ&url=https%3A%2F%2Fwp.ufpel.edu.br%2Fhistorep%2Ffiles%2F2017%2F07%2FSistema-Reprodutor-Femino.pdf&usg=AOvVaw34nRZ0WaEusOzBTjAPvFkp>
12. Silva LDM, Lima DBC. Aspecto da fisiologia reprodutiva da cadela. In: IX Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal (CONERA-2018) 2018 Anais. Belém: Faculdade de Veterinária/Universidade Estadual do Ceará; 2018. p.135-140. Disponível em:
[http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v42/n3-4/p135-140%20\(RB750\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v42/n3-4/p135-140%20(RB750).pdf)
13. Costa ECF, Léga E, Neves L. Estimativa da fase do ciclo estral por citologia vaginal em cadelas (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758). *Nucleus Animalium.* 2009; 1(2):75-84

14. Paula MC. Indução do estro em cadelas (*Canis familiaris*): Aspecto clínico [monografia na internet]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista - UNESP de São Paulo; 2009. Disponível em:
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjAxs_nsub8AhXVq5UCHdk3DNsQFnoECBcQAQ&url=https%3A%2F%2Frepositorio.unesp.br%2Fbitstream%2F11449%2F98174%2F1%2Fpaula_mc_me_botfmvz.pdf&usg=AOvVaw20a0MfutaDyWF775Q5PcbW
15. Silva LDM. Controle do ciclo estral em cadelas. *Rev Bras Reprod Anim.* 2016; 40(4):180-187
16. Kutzler MA. Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology.* 2005; 64(10):766-775
17. Derussi AAP, Lopes MD. Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela. *Rev Bras Reprod Anim.* 2009; 33 (4): 231-237
18. Cunha RO, Brair VL, Rangel PSC, Pereira IR, Magliano DC, Batista RITP, et al. Efeito da técnica de coleta e do estágio do ciclo estral na recuperação de oócitos de boa qualidade em felinos e caninos domésticos. *Rev. bras. ciênc. vet.* 2019;26 (3):104-110
19. Santana JPS. Inseminação Artificial canina utilizando sêmen fresco [tese]. Brasília: Centro Universitário da Grande Dourados, curso de pós-graduação Lato Sensu especialização em Clínica e Cirúrgica de pequenos animais; 2012 [citado 2023 mar 7]. Disponível em:<https://silo.tips/download/centro-universitario-da-grande-dourados-jaine-priscila-sousa-santana#>
20. Mello FPDS. Endocrinologia da Reprodução do macho [seminário]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004 [citado 2023 fev 10]. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lacvet/site/wp-content/uploads/2018/01/macho.pdf>
21. Uchoa DC, Silva TFP, Araújo AA, Silva LDM. Inseminação artificial em cadelas utilizando sêmen fresco diluído em água de coco. *Theriogenology.* [Periódico na internet]. 2019; [citado 2023 fev 10]; [cerca de 61p.]. Disponível em:
<https://www.uece.br/wp-content/uploads/sites/6/2019/08/Diss.DanielCouto-Uchoa.pdf>
22. Chirinéa VH. Inseminação artificial com sêmen congelado em cães [tese]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2008 [citado 2023 fev 7]. Disponível em:
https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105987/chirinea_vh_dr_botfmvz.pdf%3Fse&ved=2ahUKEwivs7G59PH8AhWGs5UCHejlA7YQFnoECEQQAQ&usg=AOvVaw0xjiQjSW3qLECaYhDqe3QJ
23. Oliveira SB, Ferreira LFL, Carvalho TF, Santos RL, Valle GR. Collection of semen in a dog with partial penectomy followed by successful artificial insemination: case report. *Bras. Med. Vet. Zootec.* 2020; 72 (5):1773-1777
24. Lopes STP, Sousa Filho MAC, Silva JHL, Barros FN, Castelo Branco MN, Melo Evangelista LS et al. Eficiência de duas técnicas de recuperação de

- espermatozoides epididimários de cães e avaliação seminal pós-criopreservação. *Bras. Med. Vet. Zootec.* 2020; 72(5):1758-1766
25. Rodrigues da Paz RC, Kuczmarski AH. Técnicas alternativas para colheita de sêmen de cão. In: XXIV Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2021) 2021 Anais. Belo Horizonte: VIII International Symposium on Animal Biology of Reproduction – Joint Meeting; 2021. p.396-401. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v45/n4/p.396-401.pdf>
 26. Colombo M, Morselli MG, Franchi G, Schäfer-Somi S, Luvoni GC. Freezability of Dog Semen after Collection in Field Conditions and Cooled Transport. *Animals*. [periódico na Internet]. 2022. [citado 2023 mar 10]; [cerca de 12 p.]. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/7/816>
 27. Lechner D, Aurich J, Schäfer-Somi S, Herbel J, Aurich C. Combined cryopreservation of canine ejaculates collected at a one- hour interval increases semen doses for artificial insemination without negative effects on post- thaw sperm characteristics. *Reprod Domest Anim*. [periódico na Internet]. 2021. [citado 2023 mar 10]; [cerca de 6 p.]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8518732/>
 28. Madeira VLH, Monteiro CLB, Da Cunha Barbosa C, Jucá RP, De Oliveira AC et al. Efeito de diferentes protocolos de descongelação sobre o sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco em pó. *Ci. Anim. Bras.* 2010; 11(4):845-852
 29. Martins dos Santos LF. Métodos de criopreservação do sêmen canino [tese]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia Faculdade de Medicina Veterinária; 2018 [citado 2023 mar 6]. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/22969/5/MetodosCriopreservacaoSemen.pdf>
 30. Bueno R. Criopreservação de Sêmen Canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento [Tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2000 [citado 2023 mar 6]. Disponível em: https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/10583/1/texto%2520completo.pdf&ved=2ahUKEwj7pt-v8vH8AhUqGLkGHbYZBw0QFnoECDQQAQ&usg=AOvVaw27IPzIHajrvuY0pO_hAIAL
 31. Abe Y, Suwa Y, Asano T, Ueta YY, Kobayashi N et al. Cryopreservation of Canine Embryos. 3a ed. Obihiro: Hokkaido Guide Dog Association; 2010.
 32. Suzuki H. Cryopreservation of Canine Embryos and Resulting Pregnancies. *Reprod. Dom. Anim.* 2012; 47(6):141-143
 33. Evangelista de Melo LS, Lopes STP, De Sousa Filho MAC, Da Silva JHL, Barros FN et al. Cinética de espermatozoides criopreservados de cães obtidos por técnicas de recuperação epididimária. *Rev. bras. Reprod. Anim.* 2020; 44(2):57-63
 34. Motheo TF. Maturação in vitro de oócitos caninos: Influência na Suplementação hormonal seriada sobre a ultraestrutura oocitária [tese]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e

- Veterinárias – Unesp. 2013 [citado 2023 mar 10]. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105924/motheo_tf_dr_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
35. Dos Santos LC. Maturação in vitro de ovócitos de cães domésticos (*Canis familiaris*) em meio adicionado de polivinil-pirrolidona [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005 [citado 2023 mar 10]. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/6122/000525293.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 36. Taş M, Evecen M, Özdaş OB, Cirit Ü, Demir K. Effect of transport and storage temperature of ovaries on in vitro maturation of bitch oocytes. *Animal Reproduction Science*. 2005 96(2006):30–34
 37. Hori T, Ushijima H, Kimura T, Kobayashi M, Kawakami E et al. Intrauterine embryo transfer with canine embryos cryopreserved by the slow freezing and the Cryotop method. *Theriogenology*. [Periódico na internet]. 2016; [citado 2023 mar 10]; [cerca de 6p.]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4976269/>
 38. Rodrigues CALS, Santos V, Lopes BB, Azzolini CR, Do Carmo BD et al. Fertilização in vitro (FIV). *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* [periódico na internet]. 2009; [citado 2023 mar 18]; 12: [cerca de 4.p]. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/yCAiLbcfw mOYk4b_2013-6-21-11-8-23.pdf