



Reprodução assistida em canídeos e procionídeos neotropicais

Assisted reproduction in neotropical canidae and procyonidae

Regina Celia Rodrigues da Paz

Laboratório de Pesquisa em Animais de Zoológico, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.
Correspondência: reginacrpaz@gmail.com

Resumo

Considerando-se que a manutenção da diversidade genética é dependente da reprodução, as biotecnologias da reprodução surgem como importantes ferramentas na preservação de espécies ameaçadas de extinção, frente à necessidade de se desenvolver métodos que aumentem a fertilidade desses animais, bem como técnicas que visem a reprodução por meio de métodos artificiais. Técnicas desenvolvidas para animais domésticos estão sendo gradualmente aplicadas em animais de zoológico, no entanto, métodos reprodutivos artificiais, quando utilizados em animais selvagens, ainda têm apresentado pouco sucesso reprodutivo. Várias são as razões para o baixo sucesso reprodutivo, dentre elas, pouco conhecimento da fisiologia básica das espécies, pobre qualidade do sêmen e/ou oócitos e dificuldade na adaptação de metodologias utilizadas em modelos experimentais. O grande potencial da reprodução assistida em espécies ameaçadas deve ser ressaltado pela possibilidade da criopreservação de sêmen e embriões, os quais serão muito valiosos geneticamente para populações futuras. Diante do limitado espaço existente em Zoológicos para manutenção de populações geneticamente viáveis de espécies ameaçadas, a criação de bancos de germoplasma surge como uma estratégia no sentido de garantir a diversidade genética das populações. Estratégias utilizando estas técnicas serão capazes de contribuir para o desenvolvimento de um manejo adequado e para conservação de inúmeras espécies ameaçadas.

Palavras-chave: biotecnologia, criopreservação, endocrinologia reprodutiva, sêmen.

Abstract

Considering that the maintenance of genetic diversity is reproduction dependent, reproduction technologies are important tools for the preservation of endangered species, through the development of methods to increase the fertility in these animals, as well the reproduction techniques through artificial methods. The potential of assisted reproduction for endangered species should be emphasized by the possibility of semen and embryos cryopreservation, which are genetically valuable for the future populations. Techniques developed for domestic animals are being gradually applied in Zoo animals, however, the application of artificial reproductive methods in wild animals has not being successful, showing low reproductive rates. Some of the several reasons for these low reproductive rates are lack of knowledgement on the species' physiology, poor sperm or oocytes quality, and difficulties in adapting from the methodologies used in experimental models. The great potential of assisted reproduction in endangered species should be highlighted by the possibility of semen and embryos cryopreservation, which are genetically valuable for future populations. Considering the zoos' limitation to maintain genetically viable populations of threatened species, the establishments of genetic banks emerge as a strategy to ensure the genetic diversity of populations.

Keywords: biotechnology, cryopreservation, reproductive endocrinology, semen.

Introdução

As técnicas utilizadas na reprodução assistida em animais selvagens são semelhantes às utilizadas em animais domésticos e consistem em colheita, avaliação e criopreservação do sêmen; inseminação artificial (IA); fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões (TE).

Vários estudos demonstram que terapias hormonais podem induzir a ovulação e/ou superovulação em animais selvagens (Pope, 2000). A indução artificial da ovulação e a superovulação são componentes importantes para a aplicação de técnicas de reprodução assistida (Feldman e Nelson, 1996), no entanto, a fisiologia básica das diferentes espécies deve ser primeiramente compreendida. Embora existam alguns registros relacionados às características seminais de várias espécies de canídeos e procionídeos neotropicais, ainda são poucos os conhecimentos quanto à fisiologia reprodutiva e habilidade de fertilização do sêmen destes animais. Da mesma maneira, estudos relacionados à aplicação das técnicas de reprodução assistida, em canídeos e procionídeos neotropicais, têm apresentado limitações devido à falta de conhecimento básico da fisiologia



normal das espécies.

Colheita de sêmen

Existem dois métodos para colheita de sêmen em animais selvagens. O primeiro é o método não ejaculatório, que consiste na colheita de sêmen da cauda do epidídimo de animais que vieram a óbito ou foram submetidos à castração ou vasectomia. O segundo é o método ejaculatório, que consiste na recuperação do sêmen utilizando vagina artificial, manipulação digital ou eletroejaculação.

Coleta de sêmen por manipulação digital ou uso de vagina artificial são indicados por promover uma ejaculação natural e ejaculados normais, no entanto, necessitam de treinamento intensivo dos animais. Esta técnica é mais efetiva para canídeos. Em trabalho realizado por Mascarenhas et al. (2002) foi possível o condicionamento de aproximação e manipulação de um lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) para colheita de sêmen por manipulação digital. O animal era proveniente da natureza e foi condicionado utilizando-se o método da recompensa com petiscos de carne que não compunham a dieta rotineira do animal. A mesma técnica foi utilizada com sucesso por Carneiro et al. (2011) e Teodoro et al. (2012) para coleta de sêmen em lobo-guara (*Chrysocyon brachyurus*). Seager et al. (1975) obtiveram sucesso na inseminação artificial de lobos (*Canis lupus*) usando sêmen congelado obtido através de manipulação digital.

A eletroejaculação é o método mais utilizado em animais selvagens, devido ao fato de poder ser realizada em animais anestesiados. No entanto, em canídeos, tem a desvantagem de causar contaminação do ejaculado por urina.

A associação de fármacos tiletamina-zolazepam tem sido o protocolo anestésico mais utilizado para a realização deste procedimento, por não determinar alterações significativas no ejaculado, no entanto, o sucesso da colheita de sêmen por eletroejaculação em animais silvestres também está relacionado à família a qual a espécie pertence e a particularidades da própria espécie, podendo variar até mesmo entre indivíduos da mesma espécie e não apenas relacionada ao protocolo anestésico utilizado para contenção.

Em coatis (*Nasua nasua*) a eletroejaculação foi eficiente para coleta de sêmen, sem determinar contaminação do ejaculado por urina, utilizando-se diferentes protocolos anestésicos (Paz et al., 2012). Segundo Barros et al. (2009) de nove amostras de sêmen de coatis colhidas por eletroejaculação apenas duas apresentaram contaminação por urina utilizando-se cetamina-xilazina.

No entanto, em estudo realizado em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) utilizando-se diferentes protocolos anestésicos houve contaminação de 100% dos ejaculados por urina, indicando que o método de eletroejaculação não foi eficiente para colheita de sêmen independente da associação de fármacos utilizada para contenção nesta espécie (Souza et al., 2011). Em lobo guará (*Crysocyon brachyurus*) contaminação de sêmen por urina após eletroejaculação também foi relatada em algumas ocasiões (Silva et al., 2004).

O aparelho utilizado para a geração dos eletrochoques é semelhante aos utilizados para eletroejaculação em bovinos, com eletrodos retais bipolares, com três tiras longitudinais em cobre. Deve-se ressaltar que as tiras de cobre devem apresentar distância de 0,4 cm entre elas e ser salientes em aproximadamente 0,2 cm. O eletrodo, previamente lubrificado com óleo mineral, deve ser introduzido no reto com as tiras longitudinais posicionadas ventralmente, exercendo leve pressão para aumentar o contato com a região do plexo pélvico. O diâmetro do eletrodo utilizado deve ser específico para cada espécie. Em coati (*Nasua nasua*) recomenda-se eletrodo com 17 cm de extensão e 1,8 cm de diâmetro, com 3 tiras longitudinais em cobre de 8,8 cm de extensão por 0,2 cm de diâmetro (Viana et al., 2007).

A série de eletrochoques segue protocolo específico, no qual são utilizados 80 estímulos elétricos divididos em 3 séries: 30 (série 1:10 estimulações 2, 3 e 4V), 30 (série 2:10 estimulações 3, 4 e 5V) e 20 (série 3:10 estimulações 4 e 5V), respectivamente (Howard, 1993).

O ciclo dos estímulos vai de aproximadamente 1 segundo da voltagem 0 até a desejada, permanecendo 2 a 3 s na voltagem desejada e retornando diretamente para a voltagem 0 por 3 s. Deve haver descanso de 10 min entre as séries (Howard, 1993).

Antes do início da série de eletrochoques, o pênis do animal deve ser exposto, examinado e lavado com solução fisiológica e gaze. A colheita do sêmen deve ser realizada em tubos plásticos aquecidos que devem ser posteriormente mantidos em banho-maria a 37°C até o término das avaliações. A cada série, os tubos devem ser trocados, com a finalidade de se evitar possíveis contaminações com urina dos ejaculados já obtidos.

Em procionídeos todos os ejaculados são utilizados, sendo o volume total de sêmen a soma dos volumes de cada ejaculado. Em canídeos o sêmen é ejaculado em três frações bastante distintas: a primeira contendo volume mínimo, a segunda rica em espermatozóides e a terceira contendo apenas líquido prostático. Neste caso, somente a segunda fração deve ser utilizada.

Avaliação do sêmen

A primeira avaliação do sêmen deve ser com relação a sua aparência. Alterações de coloração podem estar associadas a patologias dos órgãos acessórios ou testículos. O volume do ejaculado é o segundo aspecto a



ser avaliado e deve ser determinado imediatamente após a colheita. O registro do volume ejaculado fornece informações quanto à produção de sêmen em cada espécie de interesse. Para obtenção do pH, uma gota do material obtido deve ser colocada sobre tira reagente ou pHômetro. A determinação do pH é importante, pois pode indicar contaminação do sêmen por urina (pH ácido) ou bactérias (pH básico).

Para avaliação dos espermatozoides uma alíquota do ejaculado deve ser depositada sobre lâmina de vidro para microscopia, previamente aquecida a 37°C em mesa aquecedora, coberta com lamínula também aquecida a 37°C e levada ao microscópio ótico binocular. Sobre platina aquecida a mesma temperatura, o sêmen deve ser avaliado quanto à motilidade e vigor espermáticos. Os valores de motilidade são expressos em porcentagem com variação de 0-100%, sendo valor 0% para espermatozoides imóveis e 100% para máxima performance. O tipo de movimento do espermatozoide é avaliado pelo vigor em escala de 0 a 5 (0- sem motilidade, 1- fraco movimento lateral com alguma progressão, 2- moderado movimento lateral com ocasional progressão, 3- progressão lenta, 4- progressão regular, 5- progressão rápida; Howard, 1993).

A morfologia dos espermatozoides pode ser avaliada por meio da fixação do ejaculado em formol salino 10% ou glutaraldeído 2,5%, após preparação do material em câmara úmida. Para tanto devem ser contadas 200 células por lâmina em microscópio de contraste de fase, em aumento 1000X, e as anormalidades, classificadas em defeitos maiores e defeitos menores, apresentadas em porcentagem. Dentre os defeitos maiores, os espermatozoides podem ser classificados como: macrocefálicos, microcefálicos, bicefálicos, tricefálicos, com cabeça piriforme, lanciforme ou arredondada, com acrossoma anormal ou protuberante, com peça intermediária anormal, sem peça intermediária, com cauda fortemente enrolada e biflagelado. Dentre os defeitos menores podem ser encontrados espermatozoides com peça intermediária quebrada com ou sem gota, com cauda quebrada com ou sem gota, com gota proximal ou distal.

Criopreservação do sêmen

Os procedimentos de criopreservação do sêmen somente devem ser iniciados após a lavagem do mesmo por centrifugação a 300 g por 10 min em meios de cultura HEPES ou HAM'SF-10. Este procedimento é essencial para eliminação de possíveis microorganismos e também para retirada do plasma seminal.

O método de criopreservação mais utilizado em carnívoros de maneira geral é o método conhecido como “Passo Duplo” utilizando glicerol como crioprotetor. Este método consiste na utilização de diluidor em duas frações: “A” contendo constituintes nutritivos e antibióticos e “B” contendo além dos constituintes nutritivos e antibióticos, o crioprotetor.

Em canídeos uma variedade de métodos, diluidores e crioprotetores tem sido testada. Usualmente o diluidor mais utilizado em canídeos é o “Triss egg yolk” (20%) com 4% de glicerol; Amstislavsky et al., 2012). Atualmente tem se utilizado esse diluidor acrescido de Equex STM (1%), na tentativa de se aumentar a sobrevivência dos espermatozoides após o descongelamento do sêmen (Farstad, 1996; Rota et al., 1997; 1999; Zindl et al., 2006; Lockyear et al., 2009; Bencharif et al., 2010).

Em procionídeos foi possível manter a viabilidade espermática do sêmen de coatis (*Nasua nasua*) utilizando-se diluidor comercial Dilutris (Minitube®, Brasil), após centrifugação com meios Ham'sF-10 (Nutricel S.A., Brasil) ou M199 (Nutricel S.A., Brasil), seguindo a metodologia de congelamento do “Passo Duplo” (Paz e Avila, 2015; UFMT, Cuiabá, MT, Brasil; não publicado).

Segundo essa metodologia o congelamento do sêmen consiste na remoção do sobrenadante após a centrifugação do material coletado em meios de cultura e posterior ressuspensão do sedimento na fração A do diluidor, que deve estar à 37°C. Esta mistura deve ser mantida em geladeira por 2 h. Após esse intervalo acrescenta-se a fração B do diluidor, lentamente, e o sêmen é então envasado em palhetas de 0,5 ml. As palhetas são mantidas por mais 30 min em geladeira, sendo que após esse período são colocadas sob vapor de nitrogênio líquido por 20 min. Finalizando o processo as palhetas são submersas no nitrogênio líquido, colocadas em raques e podem ser conservadas em botijão de nitrogênio líquido a -196°C por tempo indeterminado.

A identificação das palhetas, raques e botijões são de extrema importância, sendo fator determinante na constituição de um banco de germoplasma que possa ser utilizado no futuro. Devemos lembrar que o material colhido poderá ser muito valioso para populações no futuro e que a segurança na utilização deste material depende de sua correta identificação. Neste caso, as palhetas devem conter a espécie (nome científico), número da tatuagem ou microchip do animal, no caso de não haver marcação pode-se colocar o nome do animal ou algo que o identifique, instituição ao qual o animal pertence e data. Em animais de vida livre as palhetas devem conter a espécie, o local onde o animal foi capturado e a data. As raques podem ser identificadas por números ou se for o caso por espécie, onde apenas palhetas de uma determinada espécie são colocadas na mesma raque. Um livro de registro, que pode ser computadorizado, é essencial para que se registrem todas as palhetas, raques e botijões, facilitando dessa maneira a localização do material posteriormente.

As razões da pobre qualidade do sêmen de animais selvagens pós-descongelamento são ainda desconhecidas e envolvem um leque de informações e características específicas para cada espécie, que ainda não estão claramente entendidas. A realização de novos testes com diferentes protocolos e diferentes crioprotetores para cada espécie de interesse são necessários para maximizar a viabilidade de espermatozoides



após procedimentos de criopreservação.

Dosagens hormonais

Recentemente surgiu uma forte tendência à adoção de técnicas não invasivas que poderiam evitar a contenção do animal para coleta de sangue. Dentre essas técnicas incluem a extração e dosagem de metabólitos hormonais em fezes e dosagem de metabólitos em urina.

Como o metabolismo e excreção de esteróides diferem significativamente entre as espécies, mesmo em espécies estreitamente relacionadas, estes métodos não invasivos devem ser validados para cada uma das espécies. A validação fisiológica deve ser realizada para demonstrar que a análise é capaz de detectar mudanças nos níveis de metabólitos esteroidais fecais e urinários, em comparação com respectivas mudanças de concentrações de esteróides no sangue. A validação reprodutiva é realizada observando como os metabólitos esteróides variam de acordo com eventos reprodutivos: ciclo estral, gestação, puberdade ou sazonalidade (Palme, 2005; Schwarzenberger, 2007).

A maioria dos Canídeos Sul Americanos são solitários e apresentam estação reprodutiva característica, formando casais que permanecem juntos apenas durante o período reprodutivo. Souza et al. (2012) demonstraram através de dosagens hormonais séricas e fecais e ultrassonografia abdominal que cachorros-domato (*Cerdocyon thous*) em cativeiro na região central do Brasil apresentaram ciclo estral anual, sazonal, com época reprodutiva ocorrendo nas estações de inverno a primavera, acasalamentos nos meses de junho a setembro e filhotes nascendo nos meses de agosto a novembro. Também demonstraram que a maturidade sexual ocorreu aos nove meses nas fêmeas.

Em lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) sinais visíveis de cio podem ser caracterizados como inchaço vaginal de coloração rósea e secreções vaginais róseas ou sanguinolentas no início do cio, que passam a apresentarem-se espessas e amareladas no final (Weinhardt e Rodden, 1995). Dosagens de esteróides fecais determinaram níveis elevados de estrógenos (231.8 ± 68.2 ng/g) seguidos de um aumento sustentado nos níveis de progestinas (27.2 ± 2.65 ug/g) em ciclos conceptivos (gestação) e níveis baixos de progestinas (7.6 ± 0.73 ug/g) em ciclos não conceptivos (Wasser et al., 1995). Neste contexto, métodos não invasivos, como a utilização de fezes para quantificação de metabólitos hormonais e determinação do perfil dos hormônios sexuais estão cada vez mais sendo utilizados em animais selvagens.

Atualmente, o método mais empregado para a dosagem de esteróides plasmáticos, urinários e fecais em mamíferos é o radioimunoensaio (RIA). Este método utiliza a especificidade de ligação de anticorpos a antígenos, sendo nesse caso, considerados antígenos os hormônios esteróides (Brown, 2008; Moreira, 2001).

Colpocitologia

Como a colpocitologia é rotineiramente utilizada no monitoramento do ciclo estral de carnívoros domésticos, é razoável se esperar uma associação similar entre a citologia vaginal e os eventos relacionados ao estro em canídeos selvagens.

Em estudo conduzido por Bittencourt et al. (2002) esfregaços vaginais foram coletados semanalmente de uma fêmea de lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) verificando-se que estes animais apresentam três fases distintas durante o ciclo reprodutivo: fase folicular, fase de receptividade sexual e fase luteínica.

Em razão da necessidade de se utilizar métodos não invasivos em animais selvagens, a colpocitologia surge como um método alternativo na detecção do estro, uma vez que é um parâmetro de diagnóstico confiável, muito utilizado em pesquisas para monitorar a progressão do ciclo estral.

Inseminação artificial

Em carnívoros de maneira geral o sucesso do método de inseminação é altamente influenciado pela local de depósito do sêmen. Inseminações artificiais usando métodos não cirúrgicos, ou seja, deposição do sêmen na vagina tem apresentado resultados inferiores quando comparado ao método cirúrgico com depósito de sêmen diretamente no corno uterino. Isto pode ser explicado pela necessidade da contenção química dos animais, sendo que a anestesia comprometeria o transporte do sêmen em fêmeas inseminadas pelo método não cirúrgico (Howard, 1993). Sucesso na inseminação artificial com depósito de sêmen no corno uterino foi descrito em algumas espécies de canídeos como raposa do Ártico (*Alopex lagopus*) e raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), sendo que IA vaginal não resultou em gestação, entretanto, o depósito de sêmen intrauterino resultou em número de gestações comparáveis as obtidas na reprodução natural destas espécies (Fougner, 1989).

Inseminação artificial intrauterina por laparoscopia

A Inseminação artificial intrauterina por vídeo-laparoscopia consiste na deposição do sêmen diretamente no interior do corno uterino utilizando uma abordagem menos invasiva.



Neste procedimento ovários e cornos uterinos podem ser acessados. Os cornos uterinos podem ser facilmente acessados e avaliados quanto à espessura, consistência e coloração em todas as espécies. Em canídeos a visualização dos ovários é dificultada pela presença de uma estrutura denominada Bursa que recobre os ovários dificultando a visualização de estruturas importantes como folículos pré-ovulatórios e corpos lúteos pós-ovulatórios.

Em canídeos oócitos são ovulados imaturos e necessitam de um período de 2-4 dias de maturação no oviduto para atingir o estágio de metáfase II e tornarem-se aptos a fertilização (Farstad et al., 2001). Seguindo os protocolos de estimulação ovariana os animais devem ser inseminados após a administração de hCG ou pLH, ou seja, após o processo de ovulação. No entanto, em canídeos o melhor momento para realização da IA também pode ser determinado pela citologia vaginal ou pela dosagem de metabólitos fecais uma vez que a ovulação é espontânea.

Para a realização do procedimento há necessidade de anestesia inalatória, sendo que o equipamento básico utilizado para laparoscopia consiste em endoscópio rígido, trocater, agulha de “Verres”, fonte de luz, insuflador (automático ou manual) e fibra ótica. Dentre os acessórios estão microcâmera acoplada a impressora e TV para captação e registro da imagem. Para inseminação artificial pinça tipo “Grasping forceps” é necessária para estabilizar o corno uterino a ser inseminado.

O aparelho reprodutor feminino é acessado por laparoscopia onde endoscópio rígido é inserido a 30°, de acordo com o plano longitudinal do animal, 2 a 4 cm cranialmente a cicatriz umbilical no abdômen insuflado. Para estabilizar o corno uterino, ao qual será introduzida a cânula para o depósito do sêmen, uma pinça tipo “Grasping forceps” é inserida lateralmente, 4 a 5 cm da cicatriz umbilical. Esta pinça auxilia na elevação do corno uterino o mais próximo possível da parede abdominal.

Para o depósito do sêmen o corno uterino é canulado utilizando-se uma agulha estéril 20G com cateter, a qual é inserida através da cavidade abdominal, próximo ao lúmen uterino. Assim que a agulha perfura o corno uterino, esta é retirada, mantendo-se o cateter. No interior do cateter deve ser inserido um tubo de polipropileno estéril, ao qual será conectada uma seringa de 1 ml contendo o sêmen a ser introduzido. O conteúdo da seringa é depositado no interior do corno uterino através do tubo de polipropileno efetuando assim a inseminação.

A importância da utilização da inseminação artificial em animais selvagens consiste na produção de indivíduos geneticamente viáveis a população, a partir de cruzamentos recomendados por um programa de manejo. No entanto, é essencial que os métodos utilizados sejam isentos de qualquer risco de contaminação ou transmissão de doenças. Nesse sentido, cuidados como avaliação reprodutiva e exame clínico completo dos animais devem ser realizados antes da utilização dos mesmos nos programas de reprodução assistida.

Referências

- Amstislavsky S, Lindeberg H, Luvoni GC.** Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in carnivora. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.164-175, 2012.
- Barros FFPC, Queiroz JPAF, Filho ACM, Santos EAA, Paula VV, Freitas CIA, Silva AR.** Use of two anesthetic combinations for semen collection by electroejaculation from captive coatis (*Nasua nasua*). *Theriogenology*, v.71, p.1261-1266, 2009.
- Bittencourt VL, De Paula TAR, Costa MELT, Malta MCC, Bastos JAB.** Acompanhamento do ciclo reprodutivo de lobo guará (*Chrysocion brachyurus*) adulta através de citologia vaginal. In: Congresso, 6; Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 11, 2002, Vitória, ES. Anais... Vitória, ES: ABRAVAS, 2002. p.88. Resumo.
- Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrie re P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D.** Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex and LDL (low density lipoproteins). *Anim Reprod Sci*, v.119, p.305-313, 2010.
- Brown JL.** Endocrine manual for hormonal assessment of wildlife species. Front Royal, VA: Endocrine Research Laboratory; Conservation & Research Center; National Zoological Park, 2008. 65p. Apostila.
- Carneiro FT, Dornelas e Silva DH, Trece AS, Carreta MJR, Oliveira AR, Paula TAR.** Caracterização morfológica do sêmen de dois lobos-guaras da microrregião de Viçosa (*Chrysocion brachyurus*) In: XIX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 19, 2011, Belo Horizonte, MG. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2011. p.37. Resumo.
- Farstad W.** Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.251-260, 1996.
- Farstad W, Hyttel P, Hafne AL, Nielsen J.** Maturation and fertilization of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes in vitro. *J Reprod Fertil Suppl*, v.57, p.161-165, 2001.
- Feldman EC, Nelson RW.** Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p.529-546.
- Fougner JA.** Artificial insemination in fox breeding. *J Reprod Fertil Suppl*, v.39, p.317-323, 1989.
- Howard JG.** Semen collection and analysis in carnivores. In: Fowler ME (Ed.). *Zoo & Wild Animal Medicine Current Therapy*. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. p.390-399.
- Lockyear KM, Goodrowe KL, Waddell WT, MacDonald SE.** Comparison of different osmolalities and egg-



yolk composition in processing media for the cryopreservation of red wolf (*Canis rufus*) sperm. *Theriogenology*, v.71, p.469-479, 2009.

Mascarenhas RMM, Carreta Júnior M, Borboleta LR, Ribeiro ECS, Bittencourt VL, Paula TAR. Condicionamento para colheita de sêmen através de manipulação digital em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). In: VI Congresso, 6; Encontro Da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 11, 2002, Vitória, ES. *Anais...* Vitória, ES: ABRAVAS, 2002. p.82. Resumo.

Moreira N, Monteiro-Filho ELA, Moraes W, Swanson WF, Graham LH, Pasqual OL, Gomes KLF, Morais RN, Wildt DE, Brown JL. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the leopardus genus. *Zoo Biol*, v.20, p.103-116, 2001.

Palme R. Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. *Ann the NY Acad Sci*, v.1046, p.75-80, 2005.

Paz RCR, Morgado TO, Viana CTR, Arruda FP, Bezerra do Nascimento DO, Guimarães LD'A. Semen collection and evaluation of captive coatis (*Nasua nasua*). *Arq Bras Med Vete Zootec*, v.64, p.318-322, 2012.

Pope CE. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*, v.53, p.163-174, 2000.

Rota A, Iguer-Quada M, Verstegen J, Linde-Forsberg C. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a TRIS extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, v.51, p.1045-1058, 1999.

Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. Effects of Equex STM paste on viability of frozen thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*, v.47, p.1093-1101, 1997.

Schwarzenberger F. The Many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *Int Zoo Yearb*, v.41, p.52-74, 2007.

Seager SWJ, Platz CC, Hodge W. Successful pregnancy using frozen semen in the wolf. *Int Zoo Yearb*, v.15, p.140-143, 1975.

Silva A.R., Morato R.G., Silva L.D.M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim Reprod Sci*, v.81, p.159-175, 2004.

Souza NP, Furtado PV, Paz RCR. Non-invasive monitoring of the estrous cycle in captive crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*). *Theriogenology*, v.77, p.233-239, 2012.

Souza NP, Guimarães LD'A, Paz RCR. Dosagem hormonal e avaliação testicular em cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) utilizando-se diferentes protocolos anestésicos. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.63, p.1224-1228, 2011.

Teodoro LO, Melo-Junior AA, Spercoski KM, Morais RN, Souza FF. Seasonal aspects of reproductive physiology in captive male Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815). *Reprod Domest Anim*, v.47, suppl. 6, p.250-255, 2012.

Viana CT, Arruda FP, Dutra IG, Nascimento DOB, Morgado TO, Mesquita Junior NC, Alves CH, Zervoudakis LKH, Paz RCR. Avaliação do método de eletroejaculação para obtenção e análise de sêmen de quatis (*Nasua nasua*) mantidos em cativeiro. *Acta Sci Vet*, v.35, p.164-166, 2007.

Weinhardt D, Rodden M. Management of reproduction. In: Fletchall NB, Rodden M, Taylor S (Ed.). *Husbandry Manual for the Maned Wolf (Chrysocyon brachyurus)*. Washington, DC: AAZV, 1995. p.29-31.

Wasser KS, Velloso AL, Rodden MD. Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. *J Fish Wildl Manag*, v.9, p.889-894, 1995.

Zindl C, Asa CS, Günzel-Apel AR. Influence of cooling rates and addition of Equex pasta on cooled and frozen-thawed semen of generic gray (*Canis lupus*) and mexican gray wolves (*C.I. baileyi*). *Theriogenology*, v.66, p.1797-1802, 2006.
