



COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE COLORAÇÃO PARA AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA ESPERMÁTICA NO SÊMEN CANINO



10.56238/edimpecto2025.022-004

Lívia Roxinol Costa

E-mail: roxinolliivia@gmail.com

Júlia Nascimento Estevam

E-mail: juliaestevammv@outlook.com

Maria Eduarda Nascimento Bastos

E-mail: Mariabastos932@gmail.com

Letícia Barreto de Araújo

E-mail: leticiabdearaujo@gmail.com

Jennifer Victória Mendes Aquino

E-mail: jennifermendesvic@gmail.com

Aline Vieira Pinheiro dos Santos

E-mail: alinevpsantos11@gmail.com

Dala Kezen Vieira Hardman Leite

E-mail: dkezen@gmail.com

RESUMO

O crescimento das famílias multiespécies no Brasil destaca a necessidade de práticas reprodutivas éticas e de alta qualidade, especialmente quando se trata de cães reprodutores. O sucesso na reprodução depende de vários fatores, sendo a avaliação seminal, especialmente a morfologia espermática, de extrema valia, com ênfase no exame andrológico completo para garantir o desempenho reprodutivo do macho. Diferentes técnicas de coloração são utilizadas com o propósito de avaliar a morfologia espermática e diagnosticar possíveis alterações que possam comprometer a fertilidade do animal. Dentre as colorações comumente empregadas, destacam-se o Panótico Rápido, Giemsa, Eosina-nigrosina, Azul de Metileno e Rosa Bengala. Cada corante apresenta suas particularidades, ressaltado, vantagens e limitações quanto à sensibilidade, praticidade e o detalhamento das estruturas espermáticas. A escolha da coloração mais adequada para a avaliação espermática deve basear-se na finalidade principal do exame, que é a identificação e caracterização de alterações morfológicas nos espermatozoides. Além disso, devem ser considerados o tempo de durabilidade da lâmina corada e a qualidade dos corantes utilizados, uma vez que esses fatores impactam diretamente na precisão dos resultados obtidos. Essas técnicas permitem melhor visualização das estruturas espermáticas, favorecendo a distinção entre defeitos maiores e menores, bem como a diferenciação entre espermatozoides viáveis e inviáveis. A adoção de métodos de coloração eficazes é essencial para diagnósticos mais acurados, contribuindo para a tomada de decisões e para a maior eficiência dos programas de reprodução assistida.



Palavras-chave: Cão. Espermatozoide. Sêmen. Coloração. Andrologia.



1 INTRODUÇÃO

Ultimamente, os cães passaram a ser considerados membros essenciais no núcleo familiar, sendo frequentemente vistos como parte da família. Inicialmente domesticados por suas habilidades de caça e proteção, os cães passaram a ocupar uma posição afetiva nas relações humanas, contribuindo para a redução do estresse, solidão e até mesmo na melhora de quadros depressivos. Essa convivência estreita tem impulsionado a busca por tratamentos mais humanizados e abordagens que possam garantir uma melhor qualidade de vida para os animais, refletindo-se em avanços nos setores de saúde, nutrição e bem-estar animal (Friedmann; Sonnenberg, 2009; Gonçalves *et al.*, 2021; Tesi *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2023).

O crescente interesse por cães de alto valor genético, selecionados de acordo com perfis comportamentais e estilos de vida específicos, tem impulsionado o uso do melhoramento genético como ferramenta fundamental na reprodução canina. No entanto, o aumento da prevalência de doenças hereditárias em raças puras reforça a necessidade de estratégias reprodutivas mais criteriosas, pautadas na saúde, bem-estar e sustentabilidade genética da espécie canina. Em vista disso, a realização de exames andrológicos é essencial para avaliar a saúde reprodutiva dos cães, detectar possíveis problemas de fertilidade e aprimorar o uso de biotecnologias, como a inseminação artificial. Essas análises possibilitam um diagnóstico mais preciso e fidedigno, favorecendo a escolha de reprodutores com maior probabilidade de sucesso reprodutivo e contribuindo para o avanço da saúde genética das raças. (Medeiros, 2018; . Monteiro *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2023).

A seleção genética de cães padronizada em relação a características físicas, acabou desconsiderando a morfologia natural dos animais e desenvolveu raças que apresentam inúmeros problemas de saúde, em sua maioria crônicos e que são contrários às condições de bem-estar animal (Corsi, 2018).

Entretanto, a prática de cruzamentos consanguíneos, ou seja, entre indivíduos com ascendência comum, tem gerado preocupações significativas. Estudos indicam que tais práticas podem levar a malformações anatômicas e ao aumento da prevalência de doenças genéticas, comprometendo a qualidade de vida dos animais (Toson *et al.*, 2015; Perissutti *et al.*, 2019; Baldassaune, 2021; Silva *et al.*, 2024). Além disso, a consanguinidade pode reduzir a variabilidade genética e aumentar a homozigose, predispondo à manifestação de genes deletérios e ao nascimento de filhotes com malformações (Silva *et al.*, 2024).

A avaliação precoce de reprodutores é uma etapa fundamental para garantir resultados positivos em termos de fertilidade. Dessa forma, a escolha de animais comprovadamente férteis contribui significativamente para a obtenção de melhores índices no manejo reprodutivo (Bastos *et al.*, 2016; Jasmim *et al.*, 2024). A seleção de cães reprodutores é fundamental para obter êxito na inseminação artificial. A confirmação de espermatogênese normal em macho jovem antes de iniciar sua vida



reprodutiva; avaliar a produção de sêmen após doença ou terapia medicamentosa e, ainda, investigar o efeito de doença prostática na qualidade do sêmen do cão, como parte de programa de Inseminação Artificial têm sido avaliados por meio do exame andrológico (Tesi *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2020).

A análise do ejaculado é realizada através do espermograma, macro e microscopicamente. Deve-se avaliar a volume, coloração, densidade, pH, aspecto e odor, que na espécie canina se apresenta com aspecto viscoso e odor classificado como *suis generis*. Quanto a análise microscópica a motilidade e vigor espermáticos, concentração e morfologia espermáticas, integridade da membrana e acrossomo, integridade da cromatina espermática, capacitação espermática são de extrema importância e podem variar de acordo com idade, raça, porte e frequência da coleta (CBRA, 2013; Santos, 2016; Jasmim *et al.*, 2024; Paiva *et al.*, 2024).

A motilidade e o vigor espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, com uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. No entanto, é a técnica mais utilizada na rotina laboratorial e continua tendo grande valor, principalmente para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade (CBRA, 2013; Arruda *et al.*, 2010).

No contexto da reprodução canina, a análise morfológica do sêmen é uma ferramenta fundamental na avaliação da fertilidade de reprodutores. A integridade morfológica dos espermatozoides está diretamente associada ao seu potencial fecundante, e anormalidades estruturais podem indicar disfunções testiculares, epididimárias ou mesmo efeitos de fatores ambientais e nutricionais. A análise da morfologia visa o exame de anormalidades estruturais do espermatozoide (Vecchietti *et al.*, 2018; Surmacz *et al.*, 2022, Andrade, 2023; Jasmim *et al.*, 2024; Paiva *et al.*, 2024). Um espermatozoide é considerado normal se a forma e o tamanho da cabeça, peça intermediária e flagelo estiverem dentro da classificação adotada para uma determinada espécie (Banaszewska *et al.*, 2015; Czubaszek *et al.*, 2019).

Na escolha da coloração ideal, deve-se considerar àquela que induza o menor número possível de alterações na estrutura morfológica dos espermatozoides, além de, evidenciar as distintas partes da célula (Maree *et al.*, 2010). Portanto, diferentes técnicas de coloração têm sido amplamente utilizadas para avaliar a morfologia dos espermatozoides em animais domésticos e humanos. Para avaliação da morfologia espermática são contados 200 espermatozoides em microscópio óptico, em um aumento de 400x ou 1000x (óleo de imersão). As alterações estruturais dos espermatozoides são classificadas em duas categorias: defeitos maiores (primários), sendo considerados mais severos e menos graves os defeitos menores (secundários). A morfologia dos espermatozoides é classificada em defeitos maiores/primários (defeitos de cabeça, acrossomo, peças intermediárias, gota protoplasmática proximal e cauda fortemente enrolada) e defeitos menores/secundários (gota protoplasmática distal, cauda dobrada/enrolada, cabeça isolada normal, cabeça gigante/curta/larga e delgado. Considera-se como ideal o sêmen com igual ou superior a 70,0% de espermatozoides morfolologicamente normais,



sendo aceitável no máximo 10,0% de total de defeitos maiores e 20,0% de defeitos menores. Posteriormente, a determinação do total de defeitos, procede-se a avaliação percentual das células espermáticas (CBRA, 2013; Andrade, 2023).

O método de coloração de lâminas de sêmen canino é uma etapa determinante na avaliação da fertilidade, porque permite identificar espermatozoides anormais, avaliar a viabilidade espermática e a integridade das membranas, influenciando diretamente na conclusão quanto à aptidão reprodutiva do animal, diagnosticando possíveis patologias. Essa prática é especialmente relevante em programas de reprodução assistida e no desempenho reprodutivo dos reprodutores (Martins *et al.*, 2020; Jasmim *et al.*, 2024). Para uma boa análise da lâmina a ser observada, são necessários alguns pré-requisitos quanto à coloração, como: formulação correta do corante, utilizando material de boa qualidade, tempo de aplicação da técnica adotada e o custo da metodologia empregada (Streits *et al.*, 2004).

O corante Panótico Rápido (Diff Quik) tem sido utilizado na avaliação morfológica de espermatozoides, bovinos, caprinos, ovinos e caninos (CBRA, 2013; Hernandez-corredor *et al.*, 2020), apresentando vantagem na rapidez e praticidade no método de coloração (Andrade, 2023). Este corante permite a avaliação da morfologia espermática, o que é fundamental para a análise da qualidade do sêmen. Esse aspecto é particularmente importante em procedimentos de inseminação artificial, onde a qualidade e a viabilidade dos espermatozoides determinam o sucesso da técnica (Silva *et al.*, 2021; Paiva *et al.*, 2024). É um corante eficaz e prático, porém apresenta algumas limitações quando comparado a outras técnicas, como a eosina-nigrosina ou a coloração de Giemsa. Estudos indicam que o corante Panótico Rápido pode ser menos sensível na detecção de defeitos morfológicos mais sutis nos espermatozoides, como alterações no acrossoma, o que pode ser um fator crítico para a avaliação da fertilidade. Ressalta-se que, devido à composição do corante Panótico Rápido as lâminas coradas não apresentam longa durabilidade, o que pode impactar a análise posterior (Linkgões *et al.*, 2003; Bastos *et al.*, 2016; Farias Júnior, 2018).

Contudo, a coloração com o Panótico Rápido apresenta como principais vantagens a agilidade na aplicação, rapidez e a simplicidade do protocolo, tornando-se uma ferramenta eficaz para avaliações iniciais de sêmen canino, especialmente em ambientes com grande volume de amostras ou que demandam um processo rápido. Principalmente, em laboratórios que não possuem uma maior estrutura tecnológica, como uso de microscópios de contraste de fase ou interferência de fase que potencializam a análise espermática, proporcionando maior detalhamento das estruturas celulares e enriquecendo os critérios diagnósticos (Souza *et al.*, 2022).

Outra como o Giemsa é especialmente útil quando se deseja uma avaliação mais acurada do que a proporcionada por corantes vitais como eosina-nigrosina. Ela é considerada uma boa alternativa em casos em que se pretende um diagnóstico mais refinado da qualidade espermática (Oliveira *et al.*, 2018). Estudos mostram que o Giemsa pode ser utilizado em esfregaços fixados com metanol, após



lavagem em tampão fosfato, com coloração variando entre 15 a 30 minutos (Lima *et al.*, 2019). Essa técnica revela detalhes como vacúolos nucleares, irregularidades de contorno da cabeça, espessamentos da peça intermediária e dobras na cauda, o que ajuda a classificar os defeitos espermáticos. Outrossim, o Giemsa tem sido usado experimentalmente para avaliar danos no acrossomo ou estruturas associadas ao DNA espermático, embora esse uso seja mais consolidado em espécies como o equino e o humano (Tartaglione *et al.*, 2004; Kútvolgyi *et al.*, 2006).

A técnica da coloração com a eosina-nigrosina é baseada na permeabilidade seletiva das membranas celulares: espermatozoides com membranas íntegras (viáveis) não absorvem a eosina e permanecem incolores ou levemente corados, enquanto aqueles com membranas danificadas absorvem o corante e aparecem com coloração rosa intensa. A nigrosina atua como corante de fundo, aumentando o contraste para facilitar a visualização. Essa coloração permite a contagem de células viáveis e não viáveis sob microscopia óptica comum e é considerada uma técnica padrão em avaliações andrológicas de cães (Matos *et al.*, 2018; Cardoso *et al.*, 2019).

A coloração do azul de metileno é um corante vital amplamente utilizado em análises morfológicas e citológicas de sêmen canino, embora menos frequente que técnicas como a eosina-nigrosina. Sua aplicação baseia-se na capacidade de penetrar células com membranas danificadas, permitindo a visualização diferenciada de células viáveis e inviáveis, além de estruturas intracelulares como núcleo e citoplasma (Medeiros *et al.*, 2019). Na citologia seminal, o azul de metileno é empregado para a coloração de esfregaços de sêmen fresco ou refrigerado, possibilitando a identificação de espermatozoides, células epiteliais, leucócitos e bactérias, o que contribui para o diagnóstico de processos inflamatórios ou infecciosos no trato reprodutor (Carneiro *et al.*, 2015).

O corante Rosa Bengala tem sido utilizado em diversas espécies animais para avaliação da morfologia espermática, inclusive em cães, devido à sua eficiência em destacar estruturas celulares e à praticidade de aplicação. Contudo, embora o Rosa Bengala apresente vantagens práticas, ele não substitui completamente técnicas mais consolidadas para avaliação de viabilidade espermática, como a coloração eosina-nigrosina. Ele é melhor empregado como ferramenta complementar ou alternativa quando não se dispõe de métodos mais específicos (Silva *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2018).



REFERÊNCIAS

- ANDRADE, H. S. Influência de diferentes métodos de coloração sobre a morfologia espermática de caprinos. 2023. 22 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Fortaleza, 2023.
- ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- BANASZEWSKA, D.; ANDRASZEK, K.; ZDROWOWICZ, E.; CZUBASZEK, M.; WALCZAK-JĘDRZEJOWSKA, R. The role of staining techniques in seminological analysis of mammalian semen. *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis Agricultura Alimentaria Piscaria et Zootechnica*, p. 5–20, 2015.
- BASTOS, Y. H. G. B.; FERREIRA, C. S.; GOMES, G. M.; PEIXOTO JÚNIOR, K. C.; GOMES, L. P. M.; PAPA, F. O.; CRESPILO, A. M. Avaliação de diferentes técnicas de coloração para esfregaços obtidos por punção biópsia aspirativa testicular de bovinos. *Revista de Saúde*, v.6, n.2, p. 5-10, 2015.
- CARDOSO, R. C.; OLIVEIRA, D. C.; SILVA, M. F. Importância da coloração eosina-nigrosina na avaliação andrológica de cães. *Revista de Ciências Veterinárias e Saúde Pública*, v.6, n.2, p. 33-40, 2019.
- CARNEIRO, M. T.; FONSECA, C. M.; LIMA, R. A. Avaliação citológica de sêmen canino utilizando a coloração com azul de metileno. *Revista de Ciências Veterinárias*, v.24, n.2, p.95-100, 2015.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013.104p.
- CUNHA, E. R.; SILVA, C. G.; CUNHA, A. T. M.; BESSLER, H. C.; MARTINS, C. F. Estudo comparativo de métodos de avaliação da morfologia, integridade de membrana plasmática e acrossoma visando à melhor forma de fiscalização do sêmen criopreservado bovino importado. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v. 9, n. 3, p. 73-73, 2010.
- CZUBASZEK, M.; ANDRASZEK, K.; BANASZEWSKA, D.; WALCZAK-JĘDRZEJOWSKA, R. The effect of the staining technique on morphological and morphometric parameters of boar sperm. *PloS one*, v.14, n.3, 2019.
- CORSI, S. Síndrome braquicefálica em cães. 2018. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
- BALDASSAUNE, H.L. Alterações congênitas em filhotes da raça Pug decorrente de acasalamento consanguíneo: Relato de caso. *Pubvet*, [S. l.], v. 15, n. 08, 2021
- FARIAS JÚNIOR, L. B. Morfologia do espermatozoide: uma revisão atualizada de técnicas de coloração e sua aplicabilidade na rotina laboratorial. 2018. 22 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- FRIEDMANN, E.; SONNENBERG, H. The human-companion animal bond: How humans benefit. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.39, n.2, p.239-326, 2009.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; GASPERIN, B. G. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal e à humana. 3. ed. São Paulo: Roca, 2021.



HERNÁNDEZ-CORREDOR, L.; LEÓN-RESTREPO, S.; BUSTAMANTE-CANO, J.; BÁEZ-SANDOVAL, J. Effect of the incorporation of plasma rich of platelets on the spermatozoa physiology of ram semen. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, v.9, n.1, p. 34-38, 2020.

JASMIM, J.S.; COSTA, C.R.; OLIVEIRA, I.M.; MEDEIROS, L.J.S.; ALMEIDA, L.E.F.; SANTOS, A.V.P.; LEITE, D.K.V.H. Importância da avaliação da morfologia na inseminação artificial (IA) na espécie canina. *Revista ft*, v.29, p.31-32, 2024.

KÚTVÖLGYI, G.; STEFLER, J.; KOVÁCS, A. Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. *Biotech Histochem*, v.81, n.4, p. 109-117, 2006.

LIMA, R. F.; BORGES, T. S.; SOUZA, C. P. Comparação entre métodos de coloração para avaliação morfológica de sêmen canino. *Ciência Animal*, v.29, n.2, p.45-52, 2019.

LINKGÓES, P. A. A.; CAVALCANTE, A. K. S.; ALMEIDA, M. A.; ZACARIOTTI, R. L.; HATAMOTO, L. K.; MANTOVANI, A. P.; NICHI, Marcilio; BARNABÉ, Valquíria Hyppólito. Utilização de técnicas de coloração para identificação da morfologia acrossomal em espermatozoides de emas (*Rhea americana*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, n. 3, p. 386–387, 2003.

MAREE, L.; DU PLESSIS, S. S.; MENKVELD, R.; VAN DER HORST, G. Dimensões morfométricas da cabeça do espermatozoide humano dependem do método de coloração usado. *Reprodução Humana*, v. 25, n. 6, p. 1369–1382, 1 jun. 2010

MARTINS, J. R.; SANTOS, F. A.; LIMA, E. C. Análise morfológica e funcional do sêmen canino: métodos e aplicações clínicas. *Revista de Reprodução Animal*, v.44, n.2, p. 87-94, 2020.

MATOS, R. S.; DIAS, R. A.; CORRÊA, L. M. Eficácia da coloração eosina-nigrosina na análise da viabilidade espermática em cães. *Archives of Veterinary Science*, v.23, n.1, p.15-21, 2018.

MEDEIROS, A. L.; OLIVEIRA, R. C.; DANTAS, J. D. F. Avaliação do sêmen canino refrigerado utilizando colorações vitais: eosina-nigrosina e azul de metileno. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias).

MEDEIROS, A. P. Perfil seminal de cães da raça Australian Cattle Dog. 2018. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

MONTEIRO, K. S.; BERGMANN, L. J.; FERREIRA, B. C. et al. Inseminação artificial e acompanhamento em uma cadela da raça Bull Terrier com histórico de agressividade: relato de caso. *Ciência Agrária*, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2020.

OLIVEIRA, R. D. R.; SILVA, A. M.; NUNES, J. F. Avaliação morfológica de espermatozoides caninos utilizando colorações de Giemsa e Rosa de Bengala. *Revista de Ciências Agrárias e Ambientais*, v.16, n 2, p.215-221, 2018.

PAIVA, J. H. C.; DEBONI, A. C. N.; MARQUES, L. F.; SILVA, L. S. B.; CHAPEL, M.E. M.; PINA, SAD, E. P.; SANTOS, A. V. P.; ALMEIDA, L.E. F.; LEITE, D. K. V.H. Applicability of Pap smear and progesterone dosage in artificial insemination. *Revista SEVEN*, capítulo 81, p. 1121-1128, 2024.

PERISSUTTI, B. C.; SCHNECKENBERG, C. H.; VOLPE, I. D.; FREITAS, M. S. As implicações do art. 34-A da Lei Estadual nº 12.854/2003 no comércio de cães e gatos em Santa Catarina. *Revista Latino-Americana de Direitos da Natureza e dos Animais*, Salvador, v. 2, n. 1, p. 77–92, 2019.



SANTOS, J. F. P. dos; GOSMES, E. T.; SIQUEIRA, A. K. M.; CARDOSO, R. de C. S. Andrologia e criopreservação de sêmen em cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 40, n. 4, p. 167–179, 2016.

SILVA, L. B. F.; MONTEIRO, M.E.; SOARES, T.J.; NUNES, A. C.B.T.; CÂMARA, D.; PEROBA, D. E. O.; LOURENÇO, M. L.G.; PACÍFICO, K. Malformações múltiplas em neonato da raça Pitbull em decorrência de acasalamento consanguíneo – relato de caso. In: RESUMO - Neonatologia de pequenos animais. Editora Even3, 2024.

SILVA, T. M.; SOUZA, A. R.; OLIVEIRA, P. C. Uso do corante Panótico Rápido para avaliação da morfologia espermática em cães: um estudo preliminar. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.45, n.3, p. 245-252, 2021.

SOUZA, A. P. C.; SANTOS, N. R. A. S.; ALMEIDA, E. F.; SANTOS, A. V. P.; LEITE, D. K. V. H. Inseminação artificial com sêmen a fresco em uma cadela da raça Pastor de Shetland: relato de caso. *Revista Ft*, v.122, n.5, p.53-56, 2023.

SOUZA, M. S.; FERREIRA, G. R.; ALMEIDA, D. A. A eficiência do corante Panótico Rápido na avaliação da viabilidade espermática canina para inseminação artificial. *Ciência Veterinária Brasileira*, v.38, n.6, p.1123-1129, 2022.

STREIT-JR, D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; SOUZA, E. D.; OLIVEIRA, C. A. L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 7, n. 2, p. 157–162, 2004.

SURMACZ, P.; NIWINSKA, A.; KAUTZ, E.; GIZINSKI, S.; FAUNDEZ, R. Comparison of two staining techniques on the manual and automated canine sperm morphology analysis. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 57, n. 6, p. 678–684, 2022.

TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermiogram parameters in the assessment of canine semen quality. *Theriogenology*, v 62, n.7, p.1245-1252, 2004.

TESI, M.; SABATINI, C.; VANNOZZI, I.; DI PETTA, G.; PANZAN, I. D.; CAMILLO, F.; ROTA, A. Variables affecting semen quality and its relation to fertility in the dog: a retrospective study. *Theriogenology*; v.18, p.34-39, 2018.

TOSON, M. R.; FARACO, C. B.; MIRANDA, I. C. S. Gotas de sabedoria: conhecimento em bem-estar e comportamento animal para alunos de veterinária. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO COLETIVO, 7., 2015, São Paulo. MV&Z – Cadernos de Pesquisa, v. 84, p. 84-85, 2015.

VECCHIETTI, P.; HAUPTLI, L.; MORAES, P. O.; AMORIM, K. A. S.; APPELT, B. C. S. Estudo das necessidades nutricionais de cães machos reprodutores. *Archives of Veterinary Science*, v. 23, n. 1, p. 13-14, 2018.