

Fabiola Bono Fukushima

**INSEMINAÇÃO INTRA-UTERINA POR VIDEOLAPAROSCOPIA COM
SÊMEN CONGELADO NA CADELA: COMPARAÇÃO ENTRE DOIS SÍTIOS
DE DEPOSIÇÃO**

Dissertação apresentada à UFMG, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência Animal, na área de
Medicina e Cirurgia Veterinárias
Orientadora: Profa. Christina Malm

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2008



F961i Fukushima, Fabíola Bono, 1981-
Inseminação intra-uterina por videolaparoscopia com sêmen congelado na cadela: comparação entre dois sítios de deposição / Fabíola Bono Fukushima. – 2008.
64 p. : il.

Orientadora: Christina Malm
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Cadela – Reprodução – Teses. 2. Inseminação artificial – Teses. 3. Laparoscopia – Teses.
4. Sêmen congelado – Teses. I. Malm, Christina. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.708 926







Aos meus pais e avós,
que muito de mim já fizeram,
sempre me apoiaram e me fizeram ir além.





AGRADECIMENTOS

À Professora Christina Malm, minha orientadora, pelo exemplo profissional, pelos ensinamentos, não só durante a realização deste trabalho, mas pelos quatro anos de convivência e amizade. Expresso aqui minha eterna gratidão e admiração;

À UFMG, à Escola de Veterinária, ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, e ao Hospital Veterinário pela oportunidade e pelo espaço sem o qual nada seria possível;

Agradeço sinceramente à Professora Cleuza, por ter me ensinado os primeiros passos da carreira acadêmica e por ter me mostrado quão fascinante é a pesquisa;

À Professora Eliane, que mais do que uma grande amiga e conselheira, fez-se uma semeadora de sonhos, dando-me novos horizontes e objetivos. Obrigada por tudo!

Ao Professor Marc Henry, expresso aqui minha eterna gratidão e admiração, muito obrigada pelo carinho, pela amizade e por todo apoio dado durante a execução do projeto, desde a idéia inicial;

À Professora Marília, pelo carinho e amizade. Serei eternamente grata!

Ao Professor José Monteiro, por ter me guiado quando estava perdida e ter me mostrado que não deveria desistir;

À Mel e à Professora Rogéria, pela paciência e por me ajudarem durante os momentos difíceis, especialmente no início do projeto;

Ao Professor Valentim, pela participação na idéia inicial do projeto e por ter nos ajudado durante a escolha do cateter de inseminação;

Aos alunos de pós-graduação Sabrina e Fátima, pelo carinho, pela amizade e por terem feito parte da nossa equipe de trabalho;

Aos demais alunos, companheiros do curso de pós-graduação Bruno, Rômulo, Letícia, Jankerle e Silke, pela amizade e pela torcida;

À Mariana Machado Neves, pela amizade, pela ajuda e colaboração e por ter sempre me ajudado nos momentos difíceis;

Aos alunos de pós-graduação do setor de Reprodução Animal, Valéria, Ester e Carlos, por me ajudarem sempre que precisei;



Às amigas residentes, Fernandinha, Valéria, Bia e Marina, pelo carinho e amizade;

Às alunas de graduação Mary, Isa e Marcelinha, não tenho palavras para agradecer tudo que fizeram por mim;

Ao ex-aluno e atual companheiro de pós-graduação Luiz Flávio, pela ajuda e amizade durante o experimento;

Aos demais alunos de graduação, Marcelo e Leonardo Miranda, pela amizade e pela pronta ajuda quando “convocados”;

À residente Laura, ao Professor Paulo Ricardo e à Renata, pela realização dos exames laboratoriais;

Aos médicos veterinários Luiz, Roberta, Eliana, Gleidice e Júnia, pela amizade e pelo apoio nos momentos que precisei;

Aos funcionários Creide, Elizete, Dorinha, Mônica, Ronaldo, Joaquim, Mércio, Gustavo, Fábio, Eliane, Laysa e Aline, pela amizade e pela disposição em ajudar;

As funcionárias do Colegiado de Pós-Graduação, Nilda e Débora, pelo carinho e paciência;

Aos auxiliares de enfermagem Elder, Tião, Liu, Messias, Ailton e Carlos, por me ajudarem sempre que precisei;

Às funcionárias Lourdes, Rosângela, Eliane e Marilene, pela paciência e amizade;

Às empresas Virbac, Duprat, Peptech, BD, Ethicon, Vetnil, Ouro Fino, Total Alimentos e Royal Canin, por terem colaborado com a doação de medicamentos, materiais hospitalares e ração;

Aos cães e gatos, grandes companheiros e razão eterna de meu estudo;

Aos melhores pais do mundo, aos meus avós lindos e meus irmãos, por todo o apoio e carinho... amo vocês!!

E, finalmente, ao Fer, pelo amor incondicional, carinho, amizade e paciência... amo muito!



AGRADECIMENTO ESPECIAL

Nesta longa caminhada, 23 cadelas e 13 filhotes passaram por aqui...

Dodói, Pic, Albina, Pretinha, Fofinha e seus 10 filhotes, Branquinha, Lady, Mel, Meg, Lobinha, Fiona, Duda, Inês, Lili, Kika, Frida, Nina e seus três filhotes, Nanda, Tuca, Tchutchu, Lindinha, Belinha e Pitucha.

Os quase 12 meses de convivência diária com estas criaturinhas tão especiais ficarão eternamente na memória... a chegada do caminhão, os mutirões para dar banho, os passeios, a hora de alimentar e de limpar os canis, além dos dias de cirurgia.

Apesar de todo o nosso empenho e amor, algumas se foram, e partiram nosso coração: Mel, Pretinha, Inês, Lili, Nanda. Outras tantas foram doadas e estão super bem!

Mas, momentos inesquecíveis como o parto de quase 24 horas da Fofinha, que terminou em cesariana, e aqueles 10 filhotes cada vez mais gordinhos e espertos trançando entre nossas pernas, serão sempre lembrados.

E, por trás de toda essa cachorrada, estavam pessoas as quais serei eternamente grata: Mary, Isa e Marcelinha, que estiveram sempre presentes nos dias de experimento, nos momentos difíceis e naqueles de pura diversão. Meninas, vocês foram demais e me ajudaram a fazer tudo isso possível! Obrigada a todas pela amizade e pelo carinho comigo e com as nossas “pequenas”!





SUMÁRIO

	Páginas
Resumo	15
Abstract	17
1. Introdução e Objetivo	19
2. Revisão de Literatura	19
2.1. Inseminação artificial	19
2.2 Sêmen congelado	20
2.3 Momento da inseminação artificial	21
2.4 Indução de estro	22
2.5 Laparoscopia	22
2.6 Migração espermática intra-uterina	23
3. Material e Métodos	23
3.1 Animais	23
3.2 Coleta, congelamento e descongelamento do sêmen	24
3.3 Determinação do anestro e indução do estro	26
3.4 Acompanhamento do estro e determinação do momento de inseminação	27
3.5 Equipamento e instrumental laparoscópico	27
3.6 Inseminação artificial intra-uterina por via laparoscópica	28
3.6.1 Avaliação intra-operatória	30
3.6.2 Avaliação dos custos	33
3.6.3 Período pós-operatório	33
3.7 Avaliação da distribuição espermática após inseminação artificial intra-uterina por via laparoscópica	33
3.7.1 Ovário-histerectomia (OVH)	33
3.7.2 <i>Imprints</i> da mucosa uterina e tubárica	34
3.8 Análise estatística	36
4. Resultados e Discussão	37
4.1 Tempo cirúrgico para inseminação artificial	37
4.2 Particularidades da abordagem laparoscópica	38
4.2.1 Visibilização e manipulação uterinas	38
4.2.2 Introdução do cateter	38
4.2.3 Ocorrência de refluxo de sêmen no sítio de deposição	39
4.2.4 Ocorrência de lesões de víscera, de vaso e hemorragia	39
4.2.5 Enfisema subcutâneo	41
4.3 Avaliação dos custos da inseminação artificial	42
4.4 Avaliação da distribuição espermática	42
5. Conclusões	51
6. Referências Bibliográficas	51
ANEXOS	57



LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1: Variações hormonais na cadela durante o proestro, estro e período ovulatório. A inseminação artificial com sêmen congelado deve ser realizada na fase tardia do período ovulatório (representada pelas setas azuis), após a maturação dos oócitos primários.	22
Figura 2: A) coleta de sêmen por manipulação digital do pênis, com auxílio de funil plástico acoplado a um tubo de centrifuga graduado e aquecido a 37°C; B) <i>pellet</i> e sobrenadante, após diluição do sêmen em meio Tris sem gema e centrifugação; C) máquina computadorizada para congelamento de sêmen.	25
Figura 3: A) palhetas em banho-maria, a 37°C, para descongelamento dos espermatozoides, em ambiente cirúrgico; B) avaliação de motilidades total e progressiva e vigor espermático pós-descongelamento; C) aspiração do sêmen descongelado imediatamente antes da inseminação artificial.	26
Figura 4: A) equipamento laparoscópico constituído por monitor de vídeo, insuflador automático conectado ao cilindro de CO ₂ , filmadora digital mini DV, microcâmera, fonte de luz de xenônio, videocassete e eletrocauterizador; B) mesa auxiliar com instrumental laparoscópico composto por agulha de Veress (V), dois conjuntos trocar-te-cânula de 11 (T1) e 6 mm (T2), endoscópio de Hopkins de 10 mm e 30° (E), pinça de apreensão com dente (P), mangueira de silicone do insuflador (M), cabo do eletrocauterizador (CE) e cateter para inseminação artificial intra-uterina (C).	28
Figura 5: Posicionamento da equipe cirúrgica, equipamento laparoscópico e anestesista em relação ao animal em decúbito dorsal na mesa cirúrgica. Posicionamento dos trocartes. V- agulha de Veress; P1 – portal 1 para óptica; P2 – portal 2 para pinça de apreensão; C1 – introdução do cateter 22G para acesso ao corpo uterino (GI); C2 – introdução do cateter 22G para acesso ao corno uterino esquerdo (GII).	29
Figura 6: Agulha de Veress e cavidade abdominal distendida, sob visibilização do endoscópio de 10mm e 30°.	31
Figura 7: Introdução da segunda cânula, para passagem da pinça de apreensão com dente.	31
Figura 8: Afastamento do omento (O) com pinça de apreensão e visibilização da bexiga urinária (B) e bifurcação uterina (BU).	
Figura 9: Corpo uterino (CU) e bifurcação uterina (BU) elevada próximo à parede abdominal, com auxílio da pinça de apreensão com dente, e sutura da sua parede com cateter de 22-G (C).	32
Figura 10: Corno uterino esquerdo tracionado, permitindo visibilização da bursa ovariana (BO), da junção útero-tubárica (JUT), da extremidade cranial do corno uterino esquerdo (CUE) e do baço, que foi previamente afastado.	32



Figura 11: Porção cranial do corno uterino esquerdo (CUE) elevada próxima à parede abdominal, com auxílio de pinça de apreensão com dente, e perfuração da sua parede com cateter 22-G (C).	32
Figura 12: Útero em posição anatômica após a deposição do sêmen e retirada do cateter. Presença de discreta quantidade de sêmen na serosa uterina, sobre o local da IA.	33
Figura 13: A) esquema de útero de cadela ilustrando ligaduras realizadas antes da ovariectomia para prevenir a migração aleatória dos espermatozoides, bem como a identificação dos segmentos que foram posteriormente avaliados; B) útero exposto, manipulado delicadamente para realização das ligaduras.	35
Figura 14: Esquema de útero de cadela ilustrando a segmentação dos cornos uterinos para realização dos <i>imprints</i> de mucosa. Cada corno uterino foi inicialmente dividido em duas partes iguais, além da junção útero-tubárica. Em seguida, cada parte maior foi dividida em três segmentos menores de igual tamanho, totalizando 14 segmentos, além do corpo uterino.	35
Figura 15: À esquerda, tuba dissecada, sendo incisada longitudinalmente. À direita, impressão da mucosa tubárica em lâmina de vidro.	36
Figura 16: À esquerda, dissecação delicada de um segmento uterino com tesoura e pinça. À direita, impressão em lâmina de vidro da mucosa de um segmento do corno uterino anteriormente dissecado e incisado longitudinalmente.	36
Figura 17: Tempo médio, em minutos, para realização da inseminação artificial no corpo do útero (G I) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (G II) ($p = 0,06$, Teste t de Student).	37
Figura 18: Tempos para realização das inseminações artificiais individuais, no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII) ($p = 0,06$, Teste t de Student).	37
Figura 19: <i>Imprint</i> da mucosa tubárica corado pela técnica de Harris-Shorr, avaliação sob microscopia óptica. Diferentes padrões de celularidade e ausência de espermatozoides. A) células da mucosa tubárica em grande quantidade (150x); B) pequena quantidade de células da mucosa tubárica (setas vermelhas) e polimorfonucleares (setas amarelas) (200x).	44
Figura 20: <i>Imprint</i> da mucosa uterina corado pela técnica de Harris-Shorr, avaliação sob microscopia óptica. A) hemácias (setas amarelas) e espermatozóide (seta vermelha) (200x); B e C) hemácias (setas amarelas), neutrófilo (setas azuis) e espermatozóide (setas vermelhas) (200x); D). hemácias (setas amarelas), neutrófilos (seta azul), células endometriais (seta verde) e espermatozóide (seta vermelha) (230x).	



Figura 21: <i>Imprint</i> da mucosa uterina corado pela técnica de Harris-Shorr, avaliação sob microscopia óptica. Ausência de espermatozóides. A) grande quantidade de hemácias (setas amarelas) e neutrófilos no centro (setas verdes) (200x). B) hemácias (seta amarela) e monócitos (seta azul) (200x).	45
Figura 22: Citologia vaginal realizada 10 minutos após o término da inseminação artificial por via laparoscópica. Retorno de espermatozóides para a vagina, confirmando a deposição do sêmen na luz uterina. A) célula superficial (seta amarela) e dois espermatozóides (setas vermelhas) (200x); B) células superficiais (setas amarelas) e intermediárias (setas azuis) e espermatozóides ao redor (setas vermelhas) (200x).	48
Figura 23: Distribuição espermática (contagem total) após IA no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII), nos diferentes segmentos genitais.	50

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Páginas
Quadro 1: Custos gerais (material de consumo, material permanente e taxas), em reais, para uma inseminação artificial, pela abordagem laparoscópica, para um animal de 10 quilos de peso corporal.	41
Tabela 1: Dados individuais de concentração de progesterona sérica (ng/ml) no momento da IA e presença (+) ou ausência (-) de corpos lúteos.	42
Tabela 2: Valores individuais de motilidades total e progressiva e vigor espermático pós-descongelamento do sêmen utilizado na inseminação artificial no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII).	43
Tabela 3: Contagem total de espermatozóides no trato genital de cadela após IA intra-uterina laparoscópica no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII). Método utilizado: <i>imprint</i> de mucosa uterina e tubárica.	47
Tabela 4: Distribuição espermática (contagem total) nos diferentes segmentos do trato genital de cadelas após IA no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII).	49
Tabela 5: Distribuição espermática por cm ² nos diferentes segmentos do trato genital de cadelas após IA no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII).	50
Tabela 6: Área, em cm ² , dos diferentes segmentos do trato genital de cadelas utilizadas para os grupos I e II (média e desvio padrão).	50



RESUMO

Objetivou-se avaliar a técnica de inseminação artificial (IA) intra-uterina por via laparoscópica quanto aos parâmetros intra-operatórios (tempo cirúrgico, complicações, dificuldades técnicas e custos), bem como comparar a distribuição espermática no útero da cadela (*imprints* de mucosa uterina e tubárica) após IA em dois sítios de deposição seminal. Foram utilizadas neste estudo 12 cadelas, sem raça definida, com peso entre seis e 17kg, distribuídas aleatoriamente em dois grupos iguais. Os animais foram submetidos à IA intra-uterina por via laparoscópica, no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII). O tempo médio para realizar a IA foi estatisticamente igual entre os dois grupos. A visibilização e a apreensão uterinas foram mais fáceis em GI, exigindo menos manobras para sua execução. Foram necessárias mais de uma punção uterina em um animal do GI e em dois animais do GII. Observou-se hemorragia discreta em dois animais de GI, por lesão de baço e de um vaso da parede uterina, e em um animal do GII, por lesão no ligamento largo. Quanto à distribuição espermática, a deposição seminal no corpo do útero (GI) permitiu o transporte de espermatozóides até a extremidade cranial de ambos os cornos e, com a deposição seminal na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII) foi possível a migração de espermatozóides até a extremidade cranial do corno uterino contralateral. O número de espermatozóides contados nos segmentos avaliados foi pequeno em relação à dose inseminante. Diversos fatores podem ter influenciado a resposta observada. Conclui-se que a IA por via laparoscópica é uma técnica viável e de custo acessível em cadelas, sendo o cateter 22-G adequado para realizar a deposição seminal. A deposição seminal no corpo do útero é mais fácil que na extremidade do corno uterino esquerdo. A IA com sêmen congelado na dose de 300×10^6 espermatozóides permitiu a distribuição espermática em toda extensão dos cornos uterinos em ambos os sítios de deposição seminal.

Palavras-chave: cadela, inseminação artificial, laparoscopia, transporte espermático, sêmen congelado.





Abstract

The aim of this study was to evaluate the technique of laparoscopic intrauterine artificial insemination (AI) in terms of intraoperative parameters (operative time, complications, technical difficulties and costs) and to compare spermatic distribution in the bitch's uterus, through oviductal and uterine mucosa imprints, after AI in two sites of seminal deposition. Twelve bitches were used in this study, all mixed-breed and weighting from 13 to 37 pounds, randomly divided in two groups of six animals. The animals were submitted to laparoscopic intrauterine AI in the uterine body (group one – GI) and in the cranial portion of the left uterine horn (group two – GII). The average time for accomplishing the AI was statistically the same in both groups. The uterine visualization and grasping were more easily performed in GI, demanding fewer maneuvers for its execution. More than one uterine puncture was needed in one animal of GI and in two of GII. Discrete hemorrhage was noticed in two animals of GI, caused by lesions in the spleen and in a blood vessel of the uterine wall; and in one of GII, due to a lesion of the broad ligament. Concerning the spermatic distribution, semen deposition in the uterine body (GI) allowed the migration of spermatozoa up to the cranial portion of both uterine horns, and semen deposition in the cranial portion of the left uterine horn (GII) permitted the spermatozoa migration up to the cranial portion of the contralateral uterine horn. The number of counted spermatozoa in the evaluated segments was small compared to the insemination dose. Several factors may have influenced the obtained results. Concluding, the laparoscopic AI is a viable technique that involves accessible costs in bitches, and the 22-G catheter is adequate to semen deposition. Semen deposition in the uterine body is easier than in the cranial portion of the left uterine horn. The AI with frozen semen, in doses of 300×10^6 spermatozoa, allowed spermatic distribution in the extension of uterine horns in both sites of seminal deposition.

Keywords: *bitch, artificial insemination, laparoscopy, spermatic migration, frozen semen.*





1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

A criação de cães de raça tem se tornado uma atividade econômica cada vez mais rentável no Brasil, visando à produção de animais de alto valor zootécnico, adequados aos padrões inerentes de cada raça. O desenvolvimento das biotécnicas da reprodução acompanha esse crescimento, com o objetivo de conservar e maximizar o uso do material genético de reprodutores, facilitar a seleção genética, bem como otimizar o aproveitamento dos estros férteis das fêmeas.

Na cadela, a inseminação artificial (IA) pode ser intravaginal ou intra-uterina, com deposição de sêmen fresco, resfriado ou congelado. A inseminação intravaginal é a mais comumente realizada, por ser de fácil execução quando comparada à inseminação intra-uterina. Contudo, estudos indicam maiores taxas de prenhez com a deposição intra-uterina do sêmen congelado ao invés da deposição intravaginal profunda. Como a cérvix representa uma barreira para acesso ao útero canino, pela via vaginal, devido à sua anatomia desfavorável para a passagem de sonda sem visibilização, a pesquisa de técnicas alternativas, as quais viabilizem a IA intra-uterina na cadela é relevante.

É importante salientar que estudos demonstram a viabilidade de técnicas de congelamento do sêmen canino e que este, após descongelamento, deve ser depositado dentro do útero, de modo que altas taxas de prenhez sejam alcançadas. Existe um forte interesse na investigação de técnicas que viabilizem a inseminação intra-uterina com sêmen congelado, já que o seu comércio é mais fácil e prático quando comparado aos riscos, dificuldades e custos no transporte de cães destinados à reprodução.

O presente estudo reveste-se de importância em relação às condições já citadas por se tratar de uma técnica pouco utilizada, minimamente invasiva, que pode proporcionar maiores taxas de fertilidade utilizando sêmen congelado de alto valor comercial e zootécnico. Essa mesma técnica também poderá ser utilizada na reprodução de carnívoros silvestres ameaçados de extinção, como cachorro-do-mato e lobo guará. Os processos reprodutivos desses animais ainda carecem de estudos, e as informações

existentes em cães domésticos vêm sendo aplicadas como conhecimento básico.

Considerando estas questões, este trabalho tem como objetivos descrever a técnica de inseminação intra-uterina por via laparoscópica na cadela, investigar sua viabilidade, comparar a distribuição espermática no trato genital da cadela após inseminação artificial, durante o período ovulatório, em dois diferentes locais: corpo do útero e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo, bem como avaliar os custos inerentes ao procedimento cirúrgico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Observa-se um crescente interesse no estudo e aprimoramento técnico-científico das biotécnicas da reprodução relacionadas à inseminação artificial (IA) em cães, buscando a otimização dos resultados já obtidos. Esse interesse está fortemente ligado à demanda por parte de criadores, surgimento de bancos de sêmen, seleção de animais doadores e preservação do material genético de animais de alto valor zootécnico. Dessa maneira, o interesse pelos métodos de conservação do sêmen canino e o estudo das técnicas de IA estão evidentemente em ascensão em vários países, mas ainda são poucos os trabalhos publicados nesta área de pesquisa (Linde-Forsberg, 2001).

2.1. Inseminação artificial

A IA consiste na deposição do sêmen no trato genital da fêmea. Esta técnica é uma alternativa quando há impossibilidade na realização da monta natural, devido a problemas anatômicos, comportamentais, patológicos e sanitários, ou ainda para utilização de sêmen resfriado ou congelado. Este último método é mais relevante, pois permite a manutenção por longo período, da fertilidade. Tecnicamente, a IA é realizada com a deposição de espermatozoides oriundos de animais de alto valor zootécnico, bem como evita os riscos e custos decorrentes da utilização de animais de baixa qualidade na reprodução (Feldman e Nelson, 1996; Silva et al., 1996; Johnston et al., 2001; Silva et al., 2003).

A IA é uma biotecnologia de reprodução antiga e foi praticada já no final do século XVIII por



Spallanzani, um monge italiano, que utilizou sêmen fresco, obtido da vagina de uma cadela naturalmente acasalada, e depositou-o, com uma seringa, na vagina de outra cadela, resultando no nascimento de três filhotes. Em 1954, Harrop descreveu a primeira IA com sêmen canino resfriado e, em 1969, Seager obteve a primeira gestação com sêmen canino congelado. Na década de 80, tiveram início vários estudos com sêmen canino fresco, resfriado e congelado, obtendo-se resultados variados e taxas de sucesso particularmente baixas com o sêmen congelado (Silva et al., 1996; Johnston et al., 2001; Silva et al., 2003; Pretzer et al., 2006).

A IA na cadela pode ser realizada por diferentes vias, dependendo se o sêmen é fresco, resfriado ou congelado. As vias de inseminação são a intravaginal com pipeta bovina ou com sonda de Osíris (Fontbonne e Badinand, 1993; Silva et al., 1996); a intra-uterina transcervical com cateter rígido metálico (Andersen, 1975; Fontbonne e Badinand, 1993; Wilson, 1993) ou com cateter Norueguês (Linde-Forsberg et al., 1999; Linde-Forsberg, 2001) ou com endoscópio (Wilson, 1993; Linde-Forsberg et al., 1999; Linde-Forsberg, 2001; Wilson, 2003); a intra-uterina via laparotomia (Linde-Forsberg, 2001; Silva et al., 2003) ou pela abordagem laparoscópica (Wildt, 1986; Silva et al., 1995; Silva e Verstegen, 1995; Silva et al., 1996; Malm et al., 2000); ou, ainda, a intratubária por laparotomia (Tsutsui et al., 2003). Contudo, cada uma das diversas vias de inseminação apresenta vantagens e desvantagens.

A inseminação intravaginal, apesar de sua facilidade de execução, não apresenta bons resultados com a utilização de sêmen congelado (Fontbonne e Badinand, 1993). Diferentemente, a cateterização transcervical com cateter rígido requer treinamento específico e pode não ser possível em animais obesos ou tensos, nos quais a manipulação abdominal da cérvix é difícil ou impossível (Wilson, 1993). A cateterização via endoscópica vem sendo largamente estudada, com resultados satisfatórios (Pretzer et al., 2006), mas enfrenta limitações quanto ao comprimento e a largura da vagina (Wilson, 1993). A técnica de inseminação intra-uterina por laparotomia exige plano anestésico cirúrgico e pode interferir na motilidade uterina e na migração dos oócitos (Silva et al., 1995). Embora a inseminação intra-uterina por via laparoscópica também necessite

de anestesia geral, tem caráter minimamente invasivo, permite a deposição do sêmen em porções mais craniais do trato genital da cadela, além de oferecer menor risco de infecção pós-operatória e recuperação mais rápida do paciente (Silva et al., 1995; Silva et al., 2003; Valocký et al., 2003).

2.2 Sêmen congelado

Embora a fertilidade da espécie canina seja geralmente alta, com taxa de prenhez de mais de 90% na monta natural, a utilização de sêmen congelado pode apresentar resultados variáveis (Andersen, 1975; Fontbonne e Badinand, 1993; Wilson, 1993; Silva e Verstegen, 1995; Silva et al., 1996; Lind-Forsberg et al., 1999; Pretzer et al., 2006). Estes resultados são consequência da influência de vários fatores como o local de deposição do sêmen, o momento da inseminação, a qualidade do sêmen, a dose inseminante e a frequência de inseminação (Wilson, 1993).

A chegada de espermatozóides maduros e funcionalmente competentes no sítio de fecundação não é um evento aleatório, mas é o auge da interação entre as células espermáticas e o trato genital da fêmea. O local de deposição do sêmen irá definir quais barreiras anatômicas os espermatozóides deverão ultrapassar para alcançar as tubas uterinas. Quando o sêmen é depositado no ambiente intra-uterino, os espermatozóides são transportados passiva e ativamente ao longo do útero e enfrentam apenas uma barreira física para acesso às tubas uterinas: a junção útero-tubárica (Scott, 2000).

Os processos de congelamento e descongelamento de sêmen, incluindo a qualidade espermática do macho, o meio diluidor e a curva de congelamento, podem reduzir a motilidade progressiva dos espermatozóides para valores menores que prejudicam a progressão espermática ao longo do trato genital da fêmea. No momento da deposição do sêmen nas porções mais craniais do útero tem como objetivo aumentar a quantidade de espermatozóides na junção útero-tubárica e consequentemente, aumentar a taxa de concepção (Wilson, 1993; Fontbonne et al., 2006).

A avaliação espermática é largamente utilizada no manejo reprodutivo, sendo de extrema



importância no monitoramento de cães destinados ao acasalamento e no diagnóstico de patologias reprodutivas. A avaliação andrológica envolve o exame completo do aparelho reprodutivo, a coleta e a análise do sêmen. A avaliação macroscópica compreende volume, aspecto, coloração e pH do ejaculado. A avaliação microscópica inclui motilidades total e retilínea progressiva, vigor espermático, concentração espermática por ejaculado, morfologia ou patologia espermática. A realização do exame andrológico é indicada para a avaliação da qualidade do sêmen a ser utilizado na IA ou para criopreservação, e nos casos de subfertilidade e patologias do sistema reprodutor (Feldman e Nelson, 1996; Vannucchi, et al., 1998; Johnston et al., 2001).

Para o sêmen congelado, além dos fatores já citados, todos os procedimentos que envolvem a manipulação e o congelamento são decisivos. A composição do meio diluidor, agentes crioprotetores e taxas de congelamento e descongelamento utilizados podem influenciar na viabilidade do sêmen após o descongelamento (Silva e Verstegen, 1995; Farstad, 2000).

Vários diluidores têm sido utilizados no congelamento do sêmen canino, contendo, geralmente, glicose ou frutose como fonte de energia (Yildiz et al., 2000; Stornelli et al., 2002; Chirinéa, 2004). O meio diluidor mais utilizado tem sido o Tris-citrato, porém outros meios compostos por dissacarídeos vêm apresentando resultados satisfatórios (Oliveira et al., 2003). O glicerol constitui o crioprotetor sintético rotineiramente mais utilizado, mas a dimetilformamida e o etilenoglicol também têm obtido excelentes resultados em várias espécies (Vannucchi et al., 1999; Oliveira et al., 2003).

2.3 Momento da inseminação artificial

Estabelecer o período correto para a IA é um ponto fundamental na reprodução da espécie canina já que há uma grande variação na duração do ciclo estral, incluindo as fases de proestro, estro e do período ovulatório (Fig. 1). Adicionalmente, quando os processos de congelamento e descongelamento de sêmen são empregados, a viabilidade dos espermatozoides no trato genital da fêmea reduz-se para menos de 24 horas, tornando essencial o acompanhamento do ciclo estral. Além disso, como na cadela, os

oócitos são viáveis por 48 a 72 horas após a sua maturação, a determinação inadequada do momento de inseminação pode culminar em baixas taxas de concepção (Farstad e Andersen-Berg, 1989; Pretzer et al., 2006).

O período fértil e o de fecundação devem ser identificados para que a IA tenha sucesso e resulte em prenhez (Jeffcoate e Lindsay, 1989; England e Concannon, 2002). O correto acompanhamento do proestro e do estro da cadela baseia-se em alguns critérios essenciais: observação das mudanças anatômicas da genitália externa e das alterações comportamentais, que são variáveis nesta espécie (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Feldman e Nelson, 1996; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Silva et al., 2003), monitoração com citologia vaginal (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Feldman e Nelson, 1996; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Silva et al., 2003), vaginoscopia para observação das modificações da mucosa vaginal (índice de crenulação) (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Feldman e Nelson, 1996; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Silva et al., 2003) e dosagens plasmáticas ou séricas de progesterona (Farstad e Andersen-Berg, 1989; Jeffcoate e Lindsay, 1989; Feldman e Nelson, 1996; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Silva et al., 2003). Fontbonne e Badinand (1993), Silva et al. (1995), Silva e Verstegen (1995), Silva et al. (1996) e Linde-Forsberg et al. (1999), ao estudarem e compararem resultados de IA pelas vias intravaginal e intra-uterina com sêmen fresco ou congelado, concordam que a associação de critérios comportamentais, exames de citologia vaginal e dosagens de progesterona possibilitam a determinação do momento ótimo para a IA na cadela.

A ovulação pode ser determinada pela receptividade sexual da cadela, associada a predominância de células de 80% de células superficiais na citologia vaginal (England e Concannon, 2002; Tsumagari et al., 2003; Pretzer et al., 2006) e a elevação sanguínea de progesterona sérica (4 a 10 ng/ml e 4 a 12 ng/ml) (Feldman e Nelson, 1996; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002). Segundo Tsumagari et al (2003), a IA com sêmen congelado deve ser realizada cinco a sete dias após o início do estro.



concentração sérica de progesterona maior ou igual a 2 ng/ml), ou seja, dois a cinco dias após o

início da ovulação.

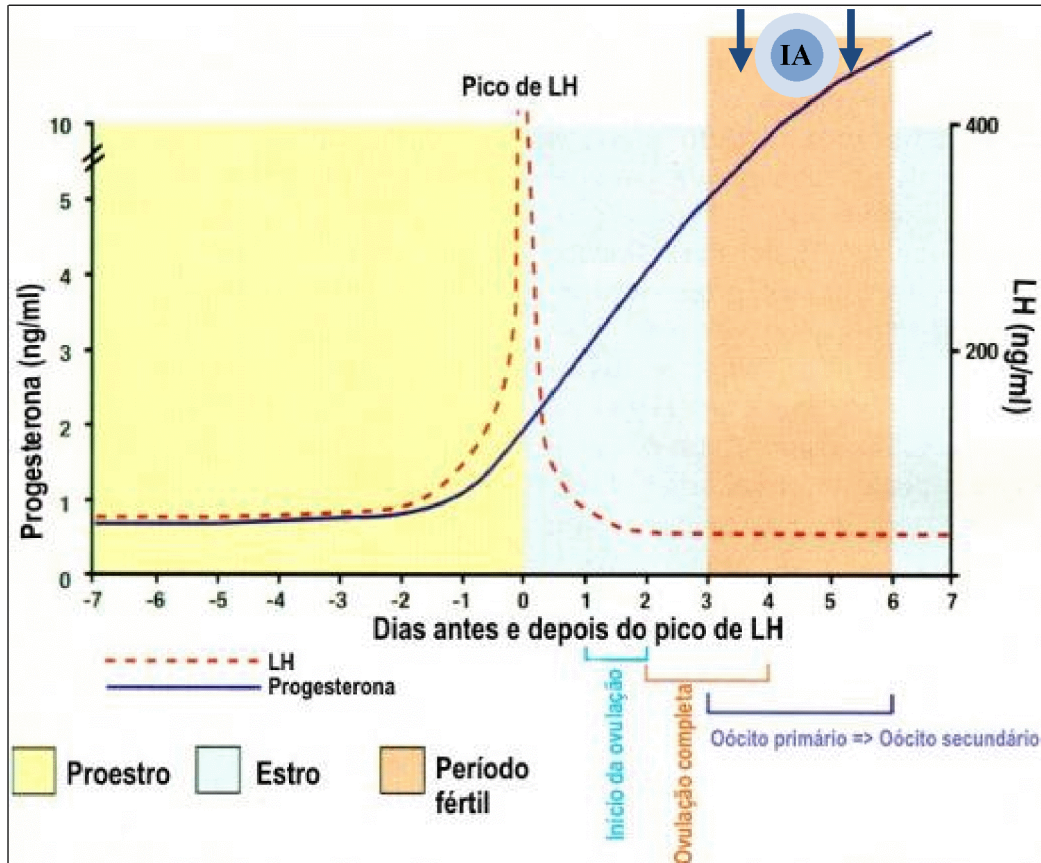


Figura 1: Variações hormonais na cadela durante o proestro, estro e período ovulatório. A inseminação artificial com sêmen congelado deve ser realizada na fase tardia do período ovulatório (representada pelas setas azuis), após a maturação dos oócitos primários. Adaptado de: www.hilltopanimalhospital.com

2.4 Indução de estro

Visto que o ciclo reprodutivo da cadela é caracterizado por um intervalo interestrual longo, que pode variar de cinco a 12 meses, a possibilidade de reduzir o ciclo reprodutivo da cadela tem sido largamente estudada. Diversos protocolos para indução de estro foram propostos, como GnRH, acetato de buserelina, bromocriptina, gonadotrofina menopausal humana (hMG), gonadotrofina coriônica equina (eCG), FSH e LH, metergolina e dietilestilbestrol (Bouchard et al., 1993; Kusuma e Tainturier, 1993; Concannon et al., 1997; Wanke et al., 1997; Zöldág et al., 2001; Rota et al., 2003; Gunay et al., 2004; Kutzler, 2005), mas os resultados são muito variáveis e são especialmente influenciados pela fase do ciclo

em que o tratamento se inicia. Neste sentido, o acetato de deslorelina é um fármaco análogo sintético ao hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), não imunogênico, capaz de induzir estro em cadelas, de forma ainda pouco conhecida. Este fármaco tem se mostrado mais eficiente na indução de estros férteis em cadelas durante o anestro do que as drogas anteriormente citadas (Kutzler, 2005; Asa et al., 2006; Volkmann et al., 2006; Kutzler, 2007).

2.5 Laparoscopia

A laparoscopia é uma abordagem cirúrgica minimamente invasiva, que apresenta vantagens como menor trauma tissular, ótima visualização de estruturas intra-abdominais, magnificação das imagens e menor incidência de complicações.



entre outros (Fraze et al., 1991; Graves et al., 1991; Savassi-Rocha, 1994). As complicações associadas à laparoscopia são raras e, geralmente, ocorrem durante a curva de aprendizado, incluindo hemorragia e lesões viscerais (Nezhat et al., 1994; Savassi-Rocha, 1995; Malm, 2004).

Quase todos os órgãos e estruturas intra-abdominais podem ser abordados em cirurgias laparoscópicas. A videolaparoscopia permite a visualização e manipulação do útero e dos ovários, possibilitando a IA em diferentes locais do útero (Valocký et al., 2003), bem como a realização de ovário-histerectomia (Minami et al., 1997; Brum, 1999; Malm, 2004) e o tratamento de síndrome do ovário remanescente (Foltynek et al., 2004).

2.6 Migração espermática intra-uterina

Na espécie canina, estudos sobre a distribuição e a sobrevivência espermática no trato reprodutivo da fêmea são limitados. Sabe-se que, para permanecerem funcionais até o momento da fertilização, os espermatozoides ficam armazenados nos reservatórios espermáticos (England e Pacey, 1998) que, na cadela estão localizados nas criptas das glândulas endometriais (Doak et al., 1967), na junção útero-tubárica (England e Burgess, 2003), e na tuba uterina - istmo e ampola (Rijsselaere et al., 2004). Entretanto, a avaliação da distribuição espermática em cães foi realizada apenas com sêmen fresco, na monta natural (Doak et al., 1967; England e Pacey, 1998; England e Burgess, 2003) e na inseminação intravaginal (Rijsselaere et al., 2004) através dos métodos de lavagem uterina e tubárica, *imprint* de mucosa e histologia com avaliação por microscopia óptica e eletrônica. Rijsselaere et al. (2004), comparando três métodos de avaliação da distribuição espermática no trato genital da cadela (lavagem uterina, histologia por microscopia óptica e eletrônica), observaram maior número de espermatozoides nos reservatórios espermáticos durante a fase ovulatória (progesterona plasmática entre 4 e 8 ng/ml). Adicionalmente, concluíram que, com sêmen fresco, na dose inseminante de 500×10^6 espermatozoides totais, a histologia uterina constitui o melhor método de avaliação.

Contudo, estudos em outras fêmeas – coelha, égua, hamster, porca, cabra e em um roedor australiano (*Antechinus*) – utilizaram, com sucesso, outros métodos de avaliação da distribuição espermática do sêmen fresco, como o lavado (Doak et al., 1967; Overstreet e Cooper, 1978; Bader, 1982; Smith e Yanagimachi, 1991; Kaocket, et al., 2002; Sumransap et al., 2007), a citologia por raspado de mucosa (Doak et al., 1967; Taggard e Temple-Smith, 1991; Taggard et al., 1999), a citologia por impressão da mucosa em lâmina de vidro (Lovell e Getty, 1968; Hunter et al., 1980) e a microscopia eletrônica de varredura (Rijsselaere et al., 2004; England et al., 2006). Entretanto, não existem, até o momento, estudos acerca da distribuição espermática com sêmen congelado após IA intra-uterina em cadelas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob protocolo número 130/2006 (Anexo 1), estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo referido comitê.

3.1 Animais

Participaram deste estudo 12 cadelas em idade adulta, sem raça definida, híginas, entre seis e 17 kg de peso corporal. Os animais eram provenientes do Canil do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte. Aqueles que apresentaram sorologia negativa para leishmaniose foram encaminhados para os canis do Centro Experimental de Pequenos Animais (Cepa) da Escola de Veterinária da UFMG, onde foram submetidos a exames de hemograma. Todas as cadelas foram vacinadas e tratadas com vermífugo à base de praziquantel, pamoato de febantel² e receberam carrapaticida composto de cifenotrina, piperonil butoxato, ivermectina³ e piperonil butoxato. Permaneceram em canis com solário, sob

¹ Vacina Canina CH(A2)PPi/LCv, Virbac®, São Paulo, Brasil.

² Dupram, Virbac, Duprat, Rio de Janeiro, Brasil.

³ Avenger, Orlabio, Fina, Pet Bem-Estar Animal, Ribeirão Preto, São Paulo.



observação durante 15 dias e, após este período, foram transferidas para canis individuais. Durante todo o período de permanência no Cepa, as cadelas receberam ração comercial⁴ em quantidade indicada pelo fabricante e água *ad libitum*.

As cadelas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos de seis animais e submetidas à IA intra-uterina por via laparoscópica com sêmen canino descongelado. Em ambos os grupos, a dose inseminante foi de 300×10^6 espermatozoides totais. No grupo I (G I), as cadelas foram inseminadas no corpo do útero, próximo à sua bifurcação e, no grupo II (G II), a IA foi realizada na extremidade cranial do corno uterino esquerdo, próximo à junção útero-tubárica.

3.2 Coleta, congelamento e descongelamento de sêmen

Fez parte do presente estudo um cão doador de sêmen, em idade adulta, sem raça definida e hígido⁵. O cão foi previamente submetido a exames clínico e andrológico completos, incluindo avaliação macroscópica (volume, odor, coloração e pH), e microscópica (motilidade total e progressiva, vigor espermático, concentração e morfologia espermática) do sêmen. A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados subjetivamente em uma escala de zero a 100% e de zero a cinco, respectivamente. A concentração foi determinada em câmara de Neubauer e a morfologia espermática pela técnica da preparação úmida, com avaliação em microscópio óptico de contraste de fase. Para que o congelamento de sêmen fosse realizado, este deveria apresentar motilidade total maior ou igual a 80%, vigor maior ou igual a 4 e menos de 25% de patologias totais (CBRA, 1998; Oliveira et al., 2003).

A coleta de sêmen foi realizada por meio de manipulação digital do pênis, sem a presença de fêmea em estro, segundo a técnica descrita por Linde-Forsberg (1991).

A primeira e a segunda frações do ejaculado, identificadas pela coloração, foram colhidas com o auxílio de um funil de plástico acoplado a tubo de centrifuga de plástico graduado, aquecido a 37°C (Fig. 2A).

Para o congelamento, o sêmen foi diluído, na proporção de 3:1 (3 ml de diluidor para um ml de sêmen), em meio Tris sem gema (T-hidroxi metilaminometano, ácido cítrico, frutose, estreptomicina e água deionizada, destilada e autoclavada) (Rodrigues, 1997) e centrifugado a 755 G durante sete minutos (Fig. 2B). O sobrenadante foi descartado e o *pellet*, ressuspendido em um mililitro de meio de congelamento Tris com gema e 5% de glicerol (T-hidroxi metilaminometano, ácido cítrico, frutose, estreptomicina, gema de ovo, glicerol e água deionizada, destilada e autoclavada) (Rodrigues, 1997). Avaliou-se a concentração espermática em câmara de Neubauer e, em seguida, adicionou-se mais uma quantidade de meio de congelamento de modo a se obter uma concentração espermática final de 100×10^6 espermatozoides totais por mililitro. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL e submetido à curva de congelamento com queda de 0,5°C/min da temperatura ambiente a 4°C, tempo de equilíbrio de uma hora e queda de 20°C/min até -120°C, obtida através da máquina computadorizada, Modelo TK 2000 – TETAKON – NUTRICELL (Fig. 2C). Em seguida, as palhetas foram submersas e estocadas em nitrogênio líquido. As avaliações de qualidade espermática pré e pós-descongelamento foram anotadas em fichas para posterior avaliação dos dados (Anexo 2).

A seleção do cão doador, coleta e congelamento do sêmen representaram a primeira etapa deste estudo, de modo que todo sêmen utilizado apresentasse pelo menos 50% de motilidade progressiva e vigor maior ou igual a 4, constituindo um lote de sêmen para este estudo.

Todo o processo de descongelamento dos espermatozoides foi realizado por via cirúrgica, precisamente no momento da deposição intra-uterina do sêmen inseminante. O sêmen foi descongelado em banho-maria, a 37°C por 30 segundos (Fig. 3). A dose inseminante foi de 300×10^6 espermatozoides totais, com motilidade progressiva pós-descongelamento de

⁴ K&S, Total Alimentos, Três Corações, Minas Gerais.

⁵ Cão doador pertencente ao canil da disciplina de Semiologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG.



no mínimo, 50% (Anexo 2) (Cremonesi et al., 2005), totalizando seis palhetas por animal. Nos dois grupos, a dose inseminante foi a mesma, e o

sêmen foi depositado em apenas um local no útero, conforme o grupo experimental.



Figura 2: A) coleta de sêmen por manipulação digital do pênis, com auxílio de funil plástico acoplado a um tubo de centrífuga graduado e aquecido a 37°C; B) *pellet* e sobrenadante, após diluição do sêmen em meio Tris sem gema e centrifugação; C) máquina computadorizada para congelamento de sêmen.





Figura 3: A) palhetas em banho-maria, a 37°C, para descongelamento dos espermatozoides, em ambiente cirúrgico; B) avaliação de motilidades total e progressiva e vigor espermático pós-descongelamento; C) aspiração do sêmen descongelado imediatamente antes da inseminação artificial.

3.3 Determinação do anestro e indução do estro

As cadelas foram submetidas à avaliação reprodutiva, composta por exame da genitália externa, observação comportamental, citologia vaginal e dosagem sérica de progesterona para determinação da fase do ciclo estral. As cadelas em anestro, 11 no total, tiveram o estro farmacologicamente induzido pelo acetato de

deslorelina⁶, um análogo do GnRH. Nestes animais, metade de um implante (1,05 mg por animal) de liberação lenta foi colocada na região torácica dorsal, entre as escápulas através de uma pequena incisão de pele e a injeção do tecido subcutâneo (Kutzler, 2005). Para tanto, foi realizada a sedação dos animais com cloridrato de

⁶ Ovuplant 2,1 mg, Fortech Animal Health, Austrália.



xilazina⁷ (1 mg/kg im) e botão anestésico local com cloridrato de lidocaína⁸ (0,5 ml/animal). Após a colocação do implante subcutâneo, a incisão foi suturada com nylon 3-0, em padrão simples separado. Apenas uma cadela apresentou cio natural.

3.4 Acompanhamento do estro e determinação do momento de inseminação

Após a determinação do anestro e implantação do acetato de deslorelina, aguardou-se o início da fase de proestro (edema e sangramento vulvar, citologia vaginal com predominância de células intermediárias, concentração de progesterona sérica maior que 1,0 ng/ml e interesse do macho pela fêmea), a partir do qual as cadelas foram acompanhadas quanto aos parâmetros comportamentais e reprodutivos, além das modificações na citologia vaginal e nas concentrações séricas de progesterona (Linde-Forsberg et al., 1999).

A avaliação reprodutiva constituiu-se por observação das modificações da genitália externa como: edema, secreção e flacidez vulvar. A avaliação comportamental foi baseada na receptividade sexual da fêmea ao macho, incluindo permanência em estação, elevação da vulva, desvio lateral da cauda e aceitação da monta (Concannon et al., 1989). Além disso, foi avaliado o interesse do macho pela fêmea, caracterizado por cheirar e lambe a vulva e tentativa de monta (Arthur et al., 1983).

Foi realizada citologia vaginal diariamente, a partir do dia de implantação do acetato de deslorelina, para acompanhamento da evolução do ciclo estral (Tsumagari et al., 2003). A citologia foi realizada na porção caudal e dorsal da vagina, com *swab* úmido, com auxílio de um espéculo vaginal, e corada pela técnica de Harris-Shorr (Badinand et al., 1993; Feldman e Nelson, 1996; Johnston et al., 2001).

Foram realizadas dosagens séricas de progesterona pelo método de quimioluminescência⁹. Amostras de sangue foram coletadas por

punção da veia jugular a partir do início do proestro, e repetidas em dias alternados, até que a concentração sérica de progesterona atingisse 2 ng/ml, sendo então repetidas diariamente até que atingisse 4 ng/ml. A IA foi executada no dia seguinte à progesterona ter atingido este valor. No dia da IA, a citologia vaginal e a dosagem hormonal foram repetidas, para confirmar o período ovulatório.

Todas as observações supracitadas foram anotadas em fichas individuais (Anexo 3) para avaliação da evolução das fases do ciclo estral e para a determinação do período ovulatório.

3.5 Equipamento e instrumental laparoscópico

Foi utilizado um equipamento laparoscópico KARL STORZ¹⁰ (Fig. 4) constituído por monitor de 14", câmera Telecam Dx; fonte de luz fria de xenônio, cabo de fibra óptica (3,5 mm e 180 cm de comprimento); insuflador de CO₂ eletrônico, endoscópio rígido Hopkins (10 mm de diâmetro e 30°), dois conjuntos trocar-te-cânula, uma pinça de apreensão com dente para apreensão uterina, além de videocassete¹¹ e filmadora digital¹², para registro das imagens.

No dia anterior ao procedimento cirúrgico, a óptica, a pinça, os trocarter e a mangueira de silicone do insuflador foram esterilizados em autoclave de ciclo rápido¹³, a 135°C durante 14 minutos. No momento da cirurgia, a microcâmera e o cabo de luz de fibra óptica foram inseridos em camisa plástica de proteção estéril¹⁴ e o instrumental esterilizado foi colocado sobre mesa auxiliar.

⁷ Anasedan® 20 mg/ml, Vetbrands do Brasil Ltda, Vinhedo, São Paulo.

⁸ Cloridrato de Lidocaína 20 mg/ml – medicamento genérico, Hypofarma, Ribeirão das Neves, Minas Gerais.

⁹ Instituto Hermes Pardini – Divisão Veterinária, Belo Horizonte, Minas Gerais.

¹⁰ KARL STORZ® GmbH&Co, Tuttlingen, Alemanha

¹¹ SHARP® Cabeças, Manaus, Brasil.

¹² JVC® Digital Video Camera, Miami, Flórida, USA.

¹³ Statim® ScicCan, Canadá.

¹⁴ Protect-can® HPE Surgical Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.



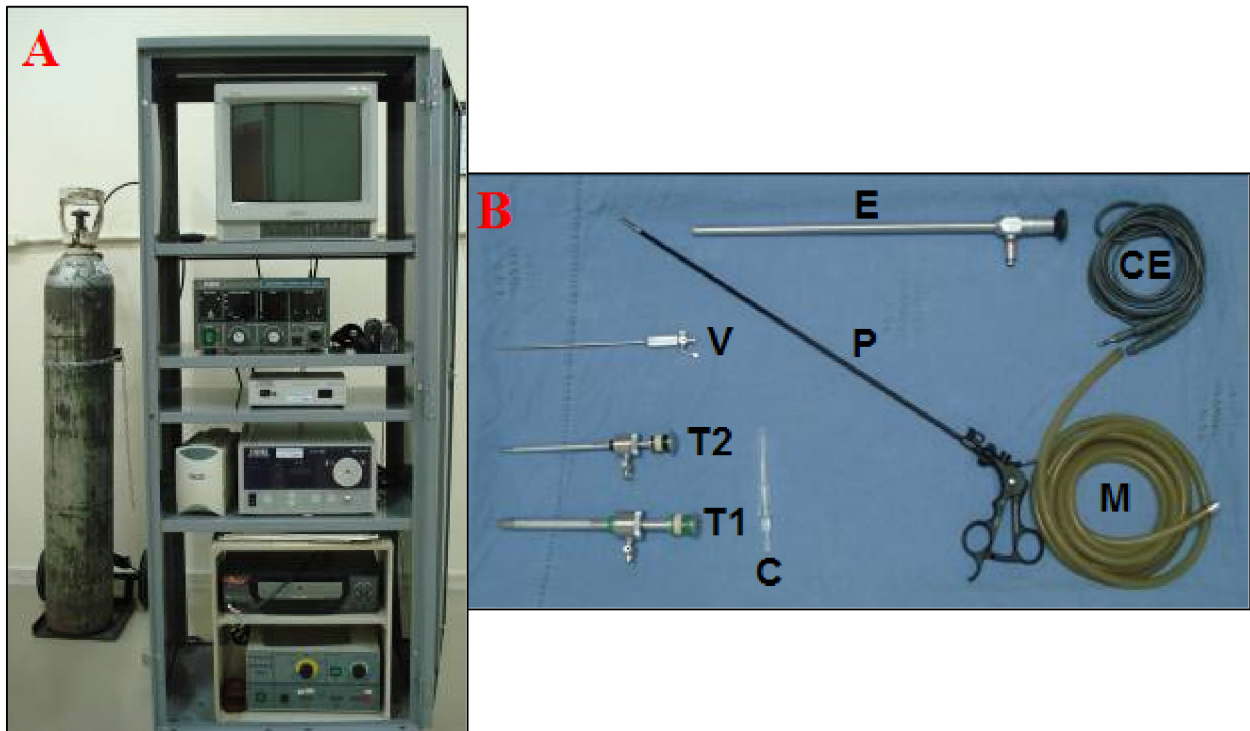


Figura 4: A) equipamento laparoscópico constituído por monitor de vídeo, insuflador automático conectado ao cilindro de CO₂, filmadora digital mini DV, microcâmara, fonte de luz de xenônio, videocassete e electrocauterizador; B) mesa auxiliar com instrumental laparoscópico composto por agulha de Veress (V), dois conjuntos trocar-cânula de 11 (T1) e 6 mm (T2), endoscópio de Hopkins de 10 mm e 30° (E), pinça de apreensão com dente (P), mangueira de silicone do insuflador (M), cabo do electrocauterizador (CE) e cateter para inseminação artificial intra-uterina (C).

3.6 Inseminação artificial intra-uterina por via laparoscópica

A IA foi única em cada cadela e realizada no período ovulatório, pois nesta fase é possível a recuperação de maior quantidade espermática (Rijsselaere et al., 2004). O momento da IA foi determinado pela citologia vaginal compatível com estro, receptividade sexual e, principalmente pela progesterona sérica entre 4 e 8 ng/ml. O sêmen descongelado foi artificialmente inseminado dentro do útero pela abordagem laparoscópica em dois diferentes sítios de deposição. No grupo I, as cadelas foram inseminadas no corpo do útero, próximo à sua bifurcação. No grupo II, a inseminação ocorreu na extremidade cranial do corno uterino esquerdo, próximo à junção útero-tubárica.

No período pré-operatório, as cadelas foram submetidas a jejum alimentar de 12 horas. Foram

pré-medicadas com acepromazina¹⁵ (0,05 mg/kg/im) e cloridrato de petidina¹⁶ (3 mg/kg/im) e, em seguida, procedeu-se a tricotomia abdominal ventral. A indução anestésica foi feita com propofol 1%¹⁷ (5 mg/kg/iv). Após a intubação orotraqueal, a anestesia foi mantida com isoflurano¹⁸ em circuito semifechado.

Foram obedecidos os seguintes tempos:

1. Posicionamento do animal em decúbito dorsal na mesa cirúrgica (Fig. 5);
2. Anti-sepsia com polivinilpirrolidona e álcool iodado 1%;
3. Colocação de campos cirúrgicos;

¹⁵ Acepran® 0,2%, Univet S/A Indústria Veterinária, São Paulo, Brasil.

¹⁶ Dolosal® 50 mg/ml, Cristália produtos químicos farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo, Brasil.

¹⁷ Fresofol 1%®, Fresenius Kabi Brasil Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil.

¹⁸ Isothane® 100 ml, Baxter Hospitalar Ltda., Santo Amaro, São Paulo, Brasil.



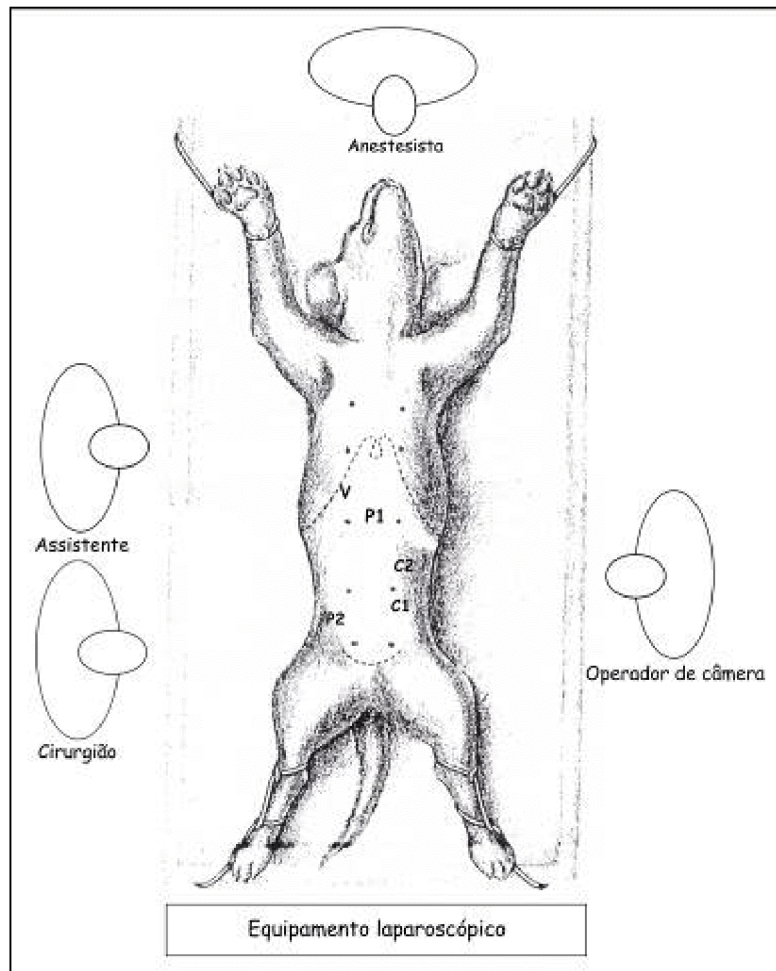


Figura 5: Posicionamento da equipe cirúrgica, equipamento laparoscópico e anestesiologista em relação ao animal em decúbito dorsal na mesa cirúrgica. Posicionamento dos trocartes. V- agulha de Veress; P1 – portal 1 para óptica; P2 – portal 2 para pinça de apreensão; C1 – introdução do cateter 22G para acesso ao corpo uterino (GI); C2 – introdução do cateter 22G para acesso ao corno uterino esquerdo (GII). Adaptado de: LEONARD, E.P. Surgical exercises for the beginner – Laparotomy. In: LEONARD, E.P. *Fundamentals of Small Animal Surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1968. Cap.6, p.141.

4. Punção da cavidade abdominal, com agulha de Veress, na região paracostal direita, e acoplamento à mangueira de silicone do insuflador de gás carbônico (CO₂) (Figs. 5 e 6);
5. Instalação gradual do pneumoperitônio, com fluxo inicial de 0,5 a um litro de CO₂ por minuto, até a pressão intra-abdominal de 8 a 10 mmHg (Ishisaki et al., 1993);
6. Incisão de pele de 1,2cm, na região pré-umbilical mediana, a dois centímetros da cicatriz umbilical, para introdução do primeiro conjunto trocarte-cânula de 11 mm,

perpendicularmente à parede abdominal, de maneira progressiva e cuidadosa, com movimentos de rotação. Uma vez introduzido o conjunto, o trocarte foi retirado, dando passagem ao endoscópio rígido, de 10 mm e 30°¹⁹, acoplado à microcâmera e ao monitor (Fig. 5);

7. Retirada da agulha de Veress e conexão da mangueira de silicone do insuflador à cânula;

¹⁹ Endoscópio rígido Hopkins KARL-STORZ® GmbH&Co, Tuttlingen, Germany



8. Exploração da cavidade abdominal e verificação de eventual lesão de víscera causada pela introdução da agulha de Veress ou do trocarce;
9. Incisão de 0,5cm, na região retro-umbilical paramediana direita, entre as mamas inguinal e abdominal caudal, para introdução do conjunto trocarce-cânula de 6 mm, para passagem da pinça de apreensão com dentes²⁰ para manipulação uterina (Figs. 5 e 7);
10. Afastamento cranial do omento através de manobras delicadas com a pinça de apreensão fechada, para melhor visibilização do útero (Fig. 8).

Em seguida, cada grupo foi inseminado em um local distinto do trato genital da cadela:

Grupo I: Após visibilização e apreensão, o corpo uterino foi elevado próximo à parede abdominal e um cateter de 22-G²¹ foi introduzido na região retro-umbilical paramediana esquerda, perfurando o corpo uterino, caudalmente à sua bifurcação (Fig. 9). Após a perfuração uterina ventral (camadas serosa, muscular e mucosa), a extremidade do mandril do cateter foi discretamente retirada para evitar a perfuração da parede uterina dorsal e a parte plástica do cateter foi avançada cranialmente no lúmen. Em seguida à confirmação do local do cateter no lúmen uterino pela movimentação do mesmo, o mandril foi retirado e 3 (três) ml de sêmen descongelado e 0,5 ml de ar foram injetados na luz do órgão para evitar o refluxo de sêmen após a retirada do cateter. A movimentação do cateter no lúmen uterino e a distensão do órgão durante a deposição seminal confirmaram a correta localização do cateter.

Grupo II: Após visibilização e apreensão, o corno uterino esquerdo foi cuidadosamente tracionado, até que fosse possível a visibilização da junção útero-tubárica e da bursa ovariana. Em todos os animais deste grupo, o baço, no seu posicionamento anatômico, na região do hipocôndrio esquerdo, recobria o corno uterino esquerdo (Fig. 10). Para tanto, o mesmo foi cuidadosamente deslocado cranialmente e para a direita. O corno uterino esquerdo foi então

elevado próximo à parede abdominal e um cateter de 22-G foi introduzido na região retro-umbilical paramediana esquerda, perfurando o corno uterino esquerdo (camadas serosa, muscular e mucosa) na sua porção cranial (Fig. 11). Na seqüência, a extremidade do mandril do cateter foi discretamente retirada para evitar perfurações adicionais, e a parte plástica do cateter foi avançada cranialmente na luz uterina, com deposição da dose seminal, em quantidade idêntica ao grupo I, na junção útero-tubárica. A escolha do lado esquerdo para deposição do sêmen foi aleatória e visou apenas à padronização da técnica. A movimentação do cateter no lúmen uterino e a distensão do órgão durante a deposição seminal confirmaram a correta localização do cateter.

Após a deposição do sêmen na luz uterina, nos dois grupos experimentais, o cateter foi retirado, o útero, colocado na sua posição anatômica (Fig. 12) e o CO₂, removido. Para finalizar o procedimento, as incisões da musculatura abdominal e da pele foram suturadas com fios cirúrgicos poliglecaprone 3.0 agulhado²² e nylon[®] monofilamento 3.0 agulhado²³ respectivamente, em padrão interrompido simples.

Dez minutos após o término do procedimento cirúrgico, foi realizada a identificação de espermatozoides pela citologia em amostra coletada no fundo de saco vaginal para comprovar a correta deposição intra-lúmen uterino dos espermatozoides descongelados. As citologias foram coradas como anteriormente descrito. A avaliação foi realizada sob microscopia óptica em objetiva de 40X.

3.6.1 Avaliação intra-operatória

Durante o procedimento foram adotados o tempo cirúrgico e o tempo necessário para realização da IA, como variáveis da abordagem laparoscópica. Durante a visibilização do útero, manipulação e introdução do cateter na luz uterina e deposição do sêmen, a ocorrência de hemorragias, lesões visuais e de vasos enfisema subcutâneo (Anexo 4).

²⁰ Claw Grasping Forceps (modelo 31431 FMS de 43 cm) KARL STORZ[®], GmbH&Co, Tuttlingen, Germany.

²¹ Insyte[®] - BD Brasil, São Paulo, Brasil.

²² Caprofil[®] - JOHNSON&JOHNSON Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

²³ Nylon[®] - JOHNSON&JOHNSON Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos, São Paulo, Brasil.



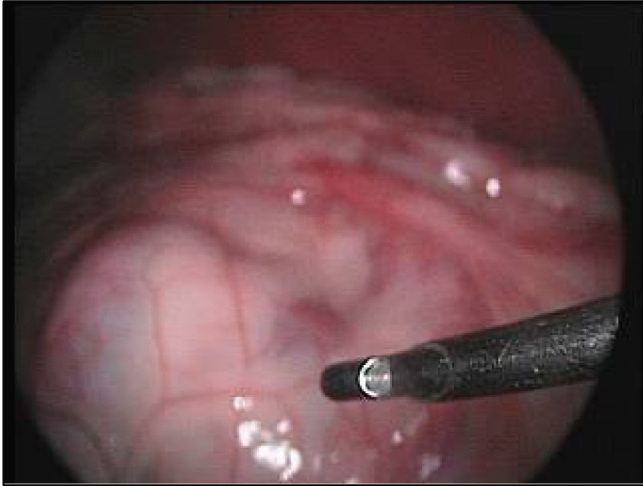


Figura 6: Agulha de Veress e cavidade abdominal distendida, sob visualização do endoscópio de 10mm e 30°.

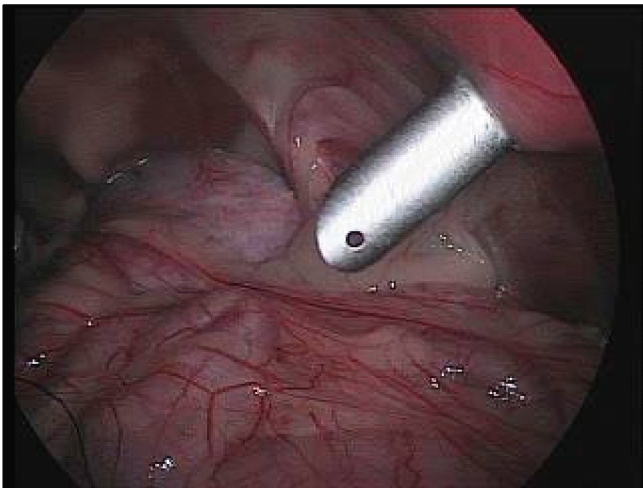


Figura 7: Introdução da segunda cânula, para passagem da pinça de apreensão com dente.

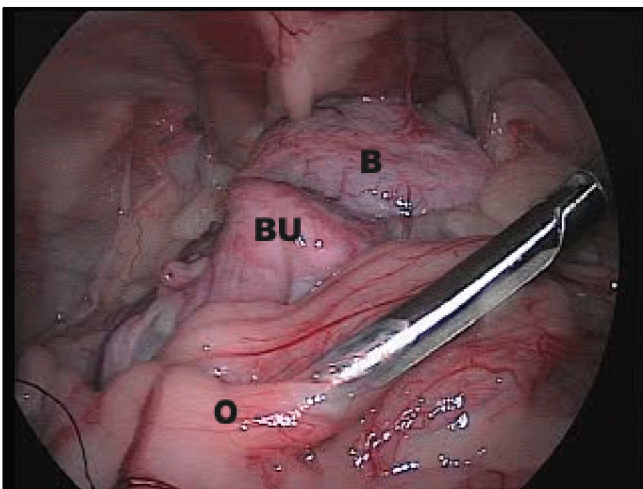


Figura 8: Afastamento do omento (O) com pinça de apreensão e visualização da bexiga urinária (B) e bifurcação uterina (BU).



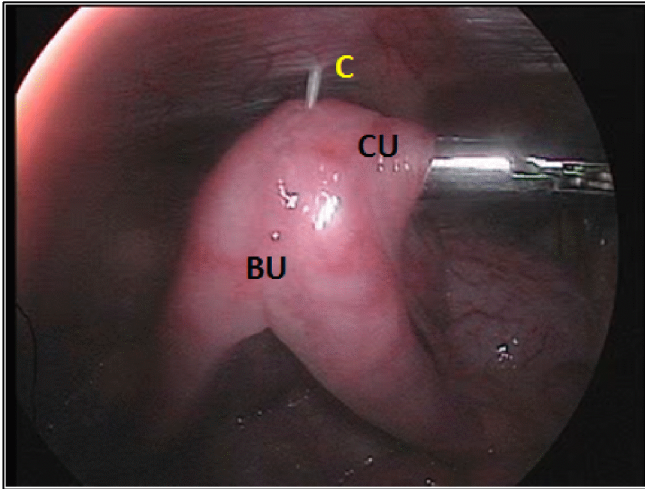


Figura 9: Corpo uterino (CU) e bifurcação uterina (BU) elevados próximo à parede abdominal, com auxílio da pinça de apreensão com dente, e perfuração da sua parede com cateter de 22-G (C).

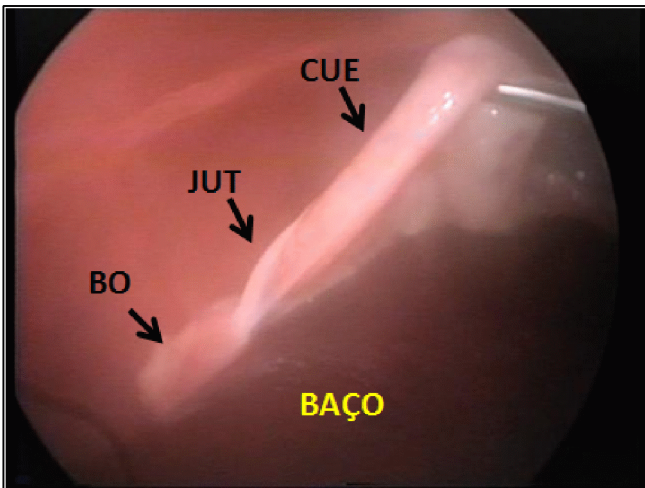


Figura 10: Corno uterino esquerdo tracionado, permitindo a visualização da bursa ovariana (BO), da junção útero-tubárica (JUT), da extremidade cranial do corno uterino esquerdo (CUE) e do baço, que foi previamente afastado.

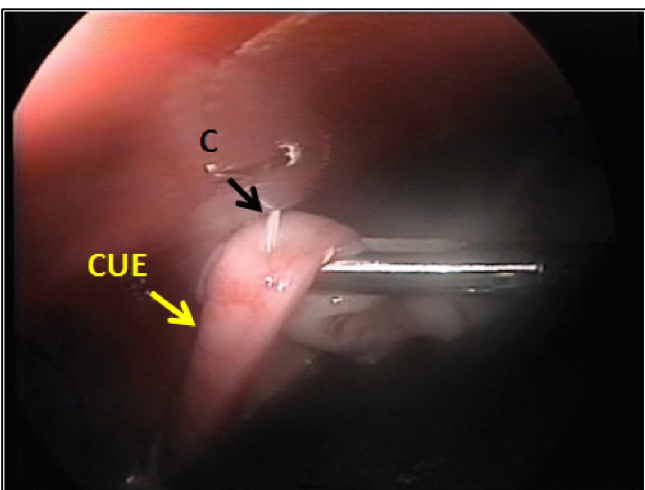


Figura 11: Porção cranial do corno uterino esquerdo (CUE) elevada próxima à parede abdominal, com auxílio de pinça de apreensão com dente, e perfuração da sua parede com cateter 22-G (C).



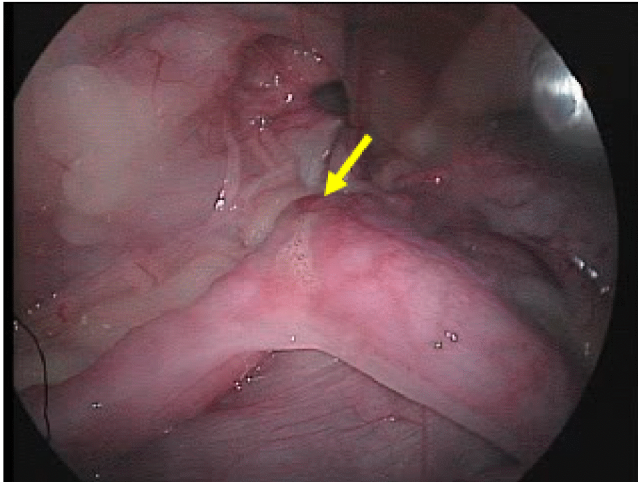


Figura 12: Útero em posição anatômica após a deposição do sêmen e retirada do cateter. Presença de discreta quantidade de sêmen na serosa uterina, sobre o local da IA.

3.6.2 Avaliação dos custos

Para avaliação dos custos do procedimento cirúrgico, foi realizado um levantamento de preços do material de consumo (medicamentos, seringas, cateter, camisas endoscópicas, luvas estéreis, gás carbônico etc), do material esterilizável pertencente ao Hospital Veterinário da UFMG (capotes, panos de campo, caixa de instrumental cirúrgico), procedimento de esterilização do instrumental laparoscópico e desgaste do equipamento laparoscópico. Desta forma, o valor final obtido representa o custo médio de um procedimento de inseminação artificial intra-uterina por via laparoscópica, sem acréscimo dos honorários da equipe cirúrgica, do anestesista e da equipe de enfermagem, bem como de qualquer rendimento adicional.

3.6.3 Período pós-operatório

No pós-operatório imediato, as cadelas foram submetidas à terapia analgésica com cetoprofeno²⁴ (1 mg/kg/im), que se prolongou por dois dias em intervalos de 24 horas. Durante o período de recuperação anestésica, os animais foram alojados em canil individual, nas dependências do Hospital Veterinário, onde permaneceram até completa recuperação anestésica.

²⁴ Ketofen® 10%, Merial Brasil, Campinas, São Paulo, Brasil.

3.7 Avaliação da distribuição espermática após IA intra-uterina por via laparoscópica

Procedeu-se a avaliação da distribuição espermática após a IA nos dois grupos. Para tanto, foi realizada ovário-histerectomia três horas após a deposição de sêmen congelado. O útero e os ovários foram cuidadosamente coletados para avaliação citológica imediata.

3.7.1 Ovário-histerectomia

As cadelas foram pré-medicadas com acepromazina²⁵ (0,05 mg/kg/im) e cloridrato de petidina²⁶ (3 mg/kg/im), submetidas à indução anestésica com propofol 1%²⁷ (5 mg/kg/iv) e, após a intubação orotraqueal, o plano anestésico foi mantido com isoflurano²⁸ em circuito semifechado.

A técnica de ovário-histerectomia consistiu em incisão abdominal retro-umbilical na linha média ventral e exposição dos cornos uterinos. Para evitar a migração espermática aleatória durante a manipulação uterina, foram realizadas sete

²⁵ Acepran® 0,2%, Crivet S/A Indústria Veterinária, São Paulo, Brasil.

²⁶ Dolosal® 50 mg/ml, Cristália produtos químicos farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo, Brasil.

²⁷ Fresofol 1%®, Fresenius Kabi Brasil Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil.

²⁸ Isothane® 100 ml, Baxter Hospitalar Ltda., Santo Amaro, São Paulo, Brasil.



ligaduras, com fio de algodão A-0 em locais pré-determinados, conforme ilustrado na Figura 13. Os pedículos ovarianos foram triplamente pinçados com pinças hemostáticas (2 Crile curvas e 1 Crile reta) e seccionados entre a pinça mais próxima ao ovário e a pinça média. A ligadura foi realizada abaixo da pinça mais distal ao ovário com fio poliglactina 910²⁹ 1 e a pinça, removida após o reposicionamento do pedículo na cavidade abdominal (Stone et al., 1998). O corpo do útero foi ligado com mesmo fio, cranialmente à cérvix, e uma pinça hemostática foi aplicada acima da ligadura. O corpo uterino foi seccionado entre a ligadura e a pinça e o coto uterino foi reposicionado na cavidade abdominal. Após o término do procedimento, realizou-se laparorráfia com fio caprofyl 2-0, em padrão de sutura Reverdin; redução do espaço morto com mesmo fio em padrão de sutura simples contínuo; e dermorrafia com fio nylon 3-0 em padrão simples separado. Durante o período de recuperação anestésica, os animais foram alojados em canil individual, onde permaneceram até completa recuperação anestésica, ainda sob efeito analgésico como anteriormente descrito.

3.7.2 *Imprints* de mucosa uterina e tubárica

Imediatamente após a ovário-histerectomia, ainda com as ligaduras aplicadas, o útero foi colocado em um recipiente contendo solução de ringer com lactato para evitar seu ressecamento. As impressões de mucosa foram realizadas em todos os segmentos uterinos e tubáricos, em triplicata, em lâminas de vidro devidamente identificadas. Realizou-se dissecação das tubas uterinas, incisão longitudinal em toda sua extensão e, em seguida, incisão transversal dividindo-a em duas metades iguais, permitindo a impressão de sua mucosa em lâminas de vidro (Fig. 15).

Posteriormente, foi feita a dissecação dos cornos e corpo uterino, segmentação dos cornos em 14 partes iguais (Fig. 14), isolamento do corpo uterino e incisão longitudinal, com posterior impressão de todas as porções em lâminas de vidro (Fig. 16). Os *imprints* foram desidratados em álcool absoluto e corados pela técnica de

Harris-Shorr para posterior contagem de espermatozóides. A contagem espermática foi realizada em microscópio óptico, em objetiva de 40X, em toda a área de todos os *imprints* de cada segmento. O útero e as tubas uterinas foram mensurados e os dados foram anotados, sendo a contagem final de cada segmento equivalente a somatória de todos os espermatozóides contados dividido pela área total do fragmento avaliado (espermatozóides/cm²).

Adicionalmente, os ovários foram coletados e avaliados macroscopicamente quanto à presença de corpos lúteos, para confirmar que a IA foi realizada no período ovulatório.

²⁹ Vicryl® - Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos, São Paulo, Brasil.



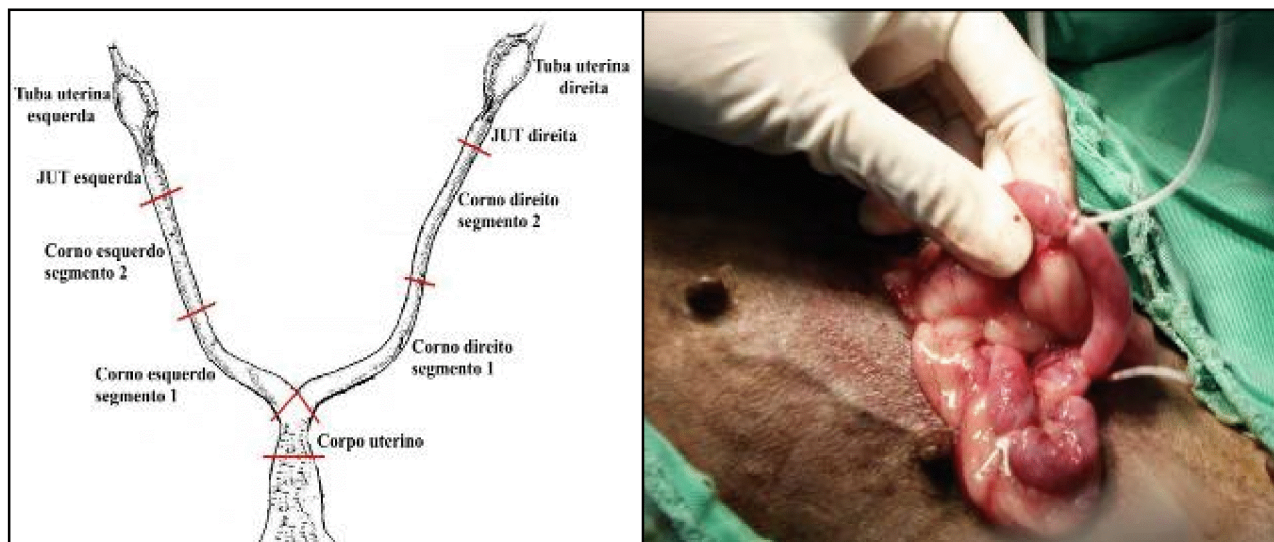


Figura 13: A) esquema de útero de cadela ilustrando ligaduras realizadas antes da ovário-histerectomia para prevenir a migração aleatória dos espermatozoides, bem como a identificação dos segmentos que foram posteriormente avaliados; B) útero exposto, manipulado delicadamente para realização das ligaduras.

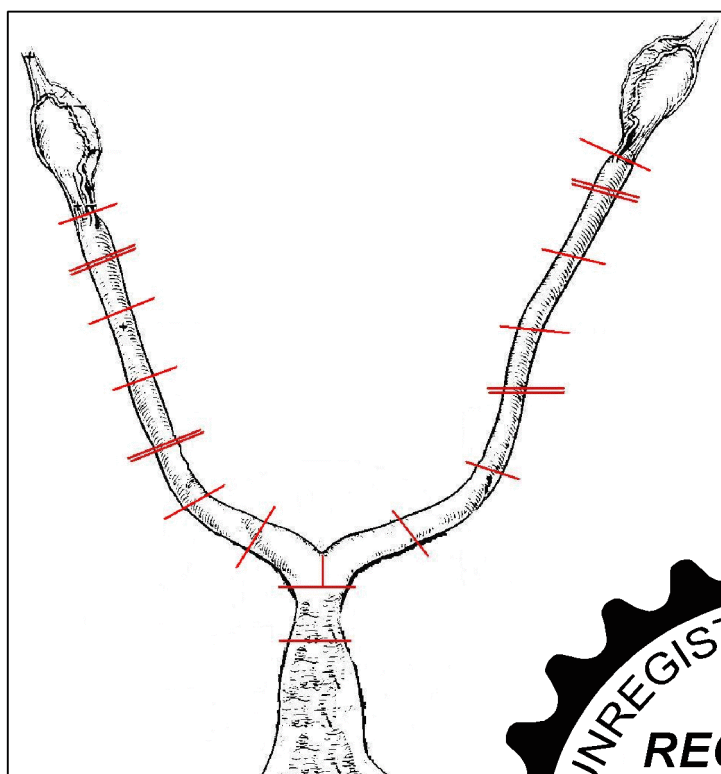


Figura 14: Esquema de útero de cadela ilustrando a segmentação dos cornos uterinos para realização dos *imprints* de mucosa. Cada corno uterino foi inicialmente dividido em duas partes iguais, além da junção útero-tubária. Em seguida, cada parte maior foi dividida em três segmentos menores de igual tamanho, totalizando 14 segmentos, além do corpo uterino.





Figura 15: À esquerda, tuba dissecada, sendo incisada longitudinalmente. À direita, impressão da mucosa tubárica em lâmina de vidro.

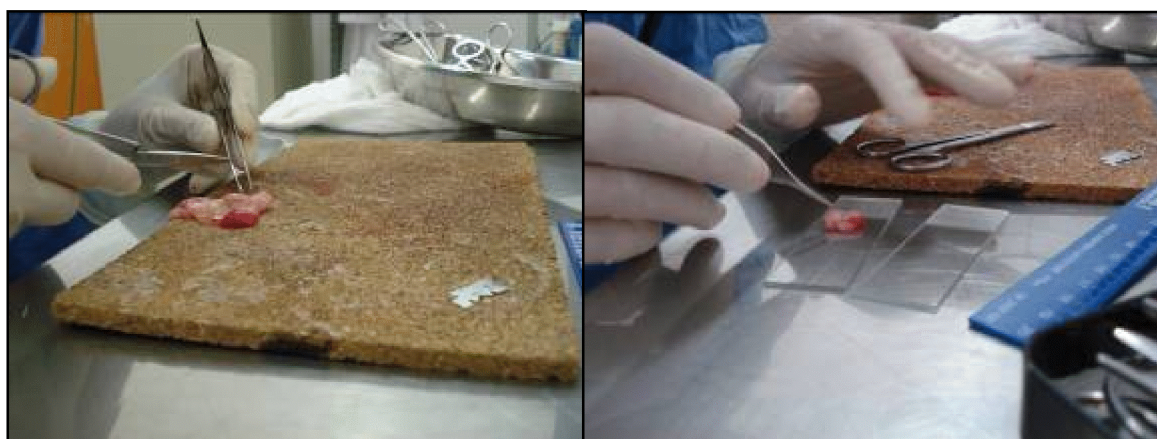


Figura 16: À esquerda, dissecação delicada de um segmento uterino com tesoura e pinça. À direita, impressão em lâmina de vidro da mucosa de um segmento do corno uterino anteriormente dissecado e incisado longitudinalmente.

3.8 Análise estatística

Para avaliação do procedimento cirúrgico e da distribuição espermática empregou-se delineamento inteiramente casualizado. Os animais foram distribuídos aleatoriamente, em dois grupos experimentais de seis animais cada ($n = 12$).

As variáveis não paramétricas com respostas dicotômicas categóricas (número de punções no útero, ocorrência de refluxo, lesões de vaso ou víscera, ocorrência de hemorragia ou enfisema, e

presença de corpo lúteo) foram analisadas pelo Teste Exato de Fisher. O tempo cirúrgico, como variável paramétrica de distribuição normal, foi analisado pelo teste t de Student.

As variáveis não paramétricas com respostas quantitativas (motilidades total e progressiva, vigor espermático e distribuição espermática total e por cm^2) foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. Na comparação de médias, a diferença foi considerada significativa quando $P < 0,05$.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tempo cirúrgico para inseminação artificial

O tempo médio necessário para realização da IA intra-uterina por via laparoscópica, desde o início do pneumoperitônio até a deposição do sêmen, foi de $25,5 \pm 7,53$ minutos (17-38 min.) e $26,67 \pm 2,94$ minutos (23-30 min.) para G I e G II, respectivamente (Fig. 17). Esta diferença mostrou-se não significativa entre os dois grupos

($p = 0,06$, Teste t de Student). Os tempos cirúrgicos individuais dos 12 procedimentos estão indicados na figura 18. Observa-se que na cadela 5 (G I), a IA ocorreu em um tempo de 38 minutos. A maior duração do procedimento neste animal deveu-se à esplenomegalia acentuada, que dificultou a realização das manobras intra-abdominais para isolamento do corpo uterino, e à perfuração esplênica e hemorragia local discreta durante a manipulação do órgão com a pinça de apreensão.

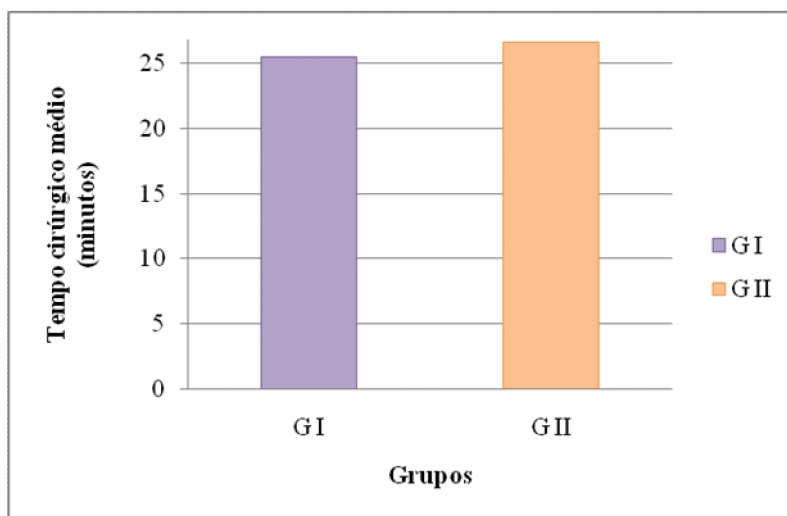


Figura 17: Tempo médio, em minutos, para realização da inseminação artificial no corpo do útero (G I) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (G II) ($p = 0,06$, Teste t de Student).

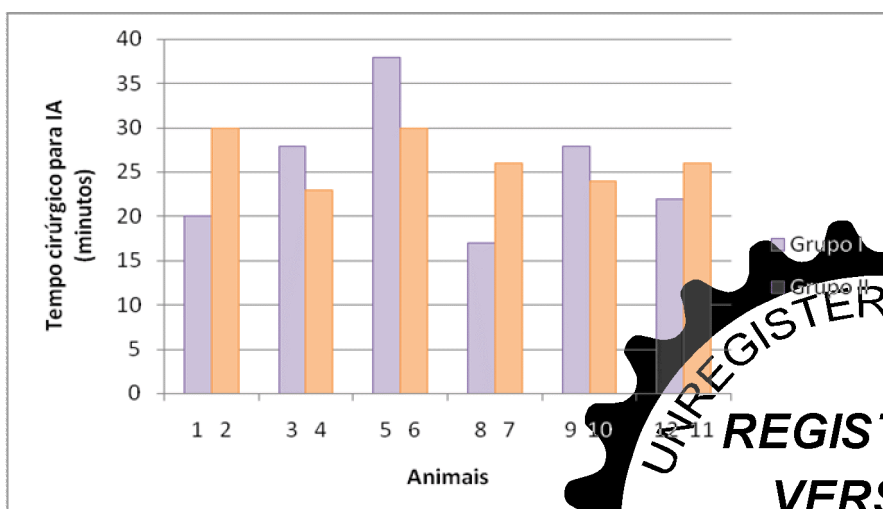


Figura 18: Tempos para realização das inseminações artificiais individuais, no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII) ($p = 0,06$, Teste t de Student).



Silva et al (1995) e Valocký et al (2003) não descrevem claramente se o tempo para a realização da IA por via laparoscópica corresponde ao tempo desde o início do pneumoperitônio até o término da sutura de pele, no entanto relatam tempo médio para a realização do procedimento cirúrgico de $10,7 \pm 3,5$ e 15 minutos, respectivamente. No presente estudo, o tempo necessário para IA foi maior que o observado pelos autores anteriormente citados, no entanto, este fato pôde ser justificado pela somatória de diversos pontos importantes. O primeiro foi a insuflação abdominal lenta (velocidade de 0,5 a 1L/min) com CO₂ para estabelecimento de pneumoperitônio, que permitisse a introdução segura do primeiro trocarte. O segundo ponto foi a inspeção da cavidade abdominal logo após a introdução da óptica, que é procedimento padrão nas cirurgias laparoscópicas com o objetivo de verificar a ocorrência de lesões ou perfurações de vasos, vísceras e outras estruturas intra-abdominais pela introdução da agulha de Veress ou do primeiro trocarte. A realização de manobras cirúrgicas de forma especialmente delicada, devido à maior vascularização uterina, para afastamento do omento e das alças intestinais, constituiu o terceiro ponto importante. O quarto fator relevante foi a necessidade de manobras adicionais, principalmente no GII, para afastamento do baço, visando à exposição da extremidade cranial do corno uterino esquerdo, de modo que permitisse a perfuração uterina próxima à junção útero-tubárica. Finalmente, o descongelamento do sêmen, que foi realizado apenas após a introdução do cateter no lúmen uterino e a confirmação de seu correto posicionamento, sendo necessários de três a quatro minutos de espera para a finalização do descongelamento.

4.2 Particularidades da abordagem laparoscópica

4.2.1 Visibilização e manipulação uterinas

A abordagem laparoscópica permite magnificação das imagens, desta forma a visibilização de órgãos e estruturas intra-abdominais fica facilitada (Fraze et al., 1991; Graves et al., 1991; Savassi-Rocha, 1994). Nas cadelas de ambos os grupos estudados, o útero estava parcialmente coberto pelo omento, e foi

facilmente identificado na região pélvica, repousando próximo à bexiga. O afastamento cranial do omento com a pinça de apreensão fechada permitiu isolamento uterino e identificação do seu corpo, bifurcação e porção caudal dos cornos. Em todos os animais, o útero encontrava-se aumentado de volume, com vasos sanguíneos evidentes, tanto na serosa quanto no ligamento largo, característico do efeito hormonal desta fase do ciclo estral (Feldman e Nelson, 1996).

Dadas as características do útero no momento da IA, sua manipulação com a pinça de apreensão com dente foi especialmente delicada. O útero não apresentou resistência durante sua tração até próximo à parede abdominal em nenhum animal do presente estudo. No grupo I, a manipulação do corpo uterino foi realizada sem dificuldades, permitindo apreensão e tração do órgão, e posterior introdução do cateter e deposição do sêmen cranialmente à pinça. No grupo II, o local para deposição do sêmen (extremidade cranial do corno uterino esquerdo) estava situado sob o baço e as alças intestinais. Deste modo, a identificação e o isolamento deste local de inseminação exigiram manobras adicionais para afastamento desses órgãos. A esplenomegalia, possivelmente decorrente do efeito anestésico (Thurmon et al., 1996), dificultou a IA em um animal do G I (animal 5) e em dois do G II (animais 10 e 11). Os locais de deposição seminal do presente trabalho diferiram daqueles utilizados por outros autores, visto que Silva et al. (1995) procederam a deposição seminal no corno uterino, próximo à sua bifurcação, e Valocký et al. (2003) realizaram IA por via laparoscópica na porção cranial e no terço médio do corno uterino direito, na bifurcação uterina e no corpo do útero. Contudo, estes autores não relataram as dificuldades encontradas durante a IA por via laparoscópica.

4.2.2 Introdução do cateter

O ideal seria a introdução do cateter para a IA fosse feita com mínima lesão da parede uterina e sangramento. Silva et al. (1995) descrevem a utilização de cateter de acesso venoso gástrico 18-G para a deposição seminal, diferentemente do cateter 22-G, de menor calibre, utilizado no presente estudo. Durante treinamento prévio realizado pela equipe cirúrgica deste trabalho, observamos que o



cateter 22-G causava menor trauma da parede uterina durante a sua perfuração e apresentava comprimento suficiente para permanecer no lúmen uterino durante a IA. Este cateter apresentou-se vantajoso, promovendo menor lesão tecidual e minimizando os riscos de hemorragia local. É importante destacar que, no momento da IA, devido à ótima visibilização uterina conferida pela abordagem laparoscópica, foi possível escolher uma área com menor vascularização do órgão.

A introdução do cateter foi única em cinco animais do G I e em quatro animais do G II. No grupo I, um animal (cadela 8) necessitou de duas punções para a realização da IA. No grupo II, em um animal (cadela 6) foram necessárias seis punções, pois o cateter atravessou a parede dorsal do útero duas vezes e permaneceu na submucosa por três vezes; na cadela 11, foram realizadas duas punções, pois houve refluxo parcial durante a inseminação, sendo necessária nova perfuração para repetir a introdução do sêmen. A diferença entre os grupos quanto à introdução do cateter não foi significativa ($p = 1$, Teste Exato de Fisher). Para adequada introdução do cateter no útero e deposição seminal, fez-se necessário o treinamento de toda a equipe cirúrgica para reprodução de imagem de qualidade e sincronização de movimentos. Este último revestiu-se de especial importância, pois o assistente tinha a tarefa de tracionar o útero de forma a posicioná-lo encostado à parede abdominal, em ângulo que permitisse ao cirurgião a introdução do cateter no lúmen, sem que este atravessasse a parede dorsal do órgão. Valocký et al. (2003), utilizando cateter semelhante ao empregado por Silva et al. (1995), observam que a sua correta introdução deve ser suave e livre de resistência, permitindo a movimentação do mesmo na luz uterina. Silva et al. (1995) descrevem a retirada do mandril após a introdução do cateter, antes da deposição seminal, diferentemente de Valocký et al. (2003). Contudo, foi observado no presente estudo que a introdução apenas da extremidade do cateter, seguida por retração da ponta do mandril e progressão da parte plástica, minimizou o risco de perfuração da parede dorsal do órgão.

A citologia vaginal realizada 10 minutos após a IA, conforme relatado por Silva et al. (1995) e Valocký et al. (2003), reafirmou o correto posicionamento do cateter e a deposição seminal

no lúmen uterino em todas as cadelas do presente estudo.

4.2.3 Ocorrência de refluxo de sêmen no sítio de deposição

A introdução do sêmen foi realizada sem complicações em todos os animais do grupo I. No grupo II, apenas um animal apresentou refluxo parcial do sêmen devido ao deslocamento do cateter durante a inseminação, sendo necessárias repetição da punção uterina e inseminação com metade da dose. A diferença entre os grupos quanto à ocorrência de refluxo no sítio de deposição seminal não foi significativa ($p = 1$, Teste Exato de Fisher). Silva et al. (1995) e Valocký et al. (2003), ao descreverem a técnica de IA por via laparoscópica na cadela, não citam a ocorrência de refluxo no sítio de deposição seminal.

Em todos os animais do G II houve resistência durante a introdução do sêmen, fato não observado no G I. Para reduzir a pressão intraluminal e, assim, introduzir três mililitros de sêmen e meio mililitro de ar sem que houvesse resistência, a pinça de apreensão, que estava posicionada na extremidade cranial do corno uterino esquerdo, próximo à junção útero-tubárica, foi suavemente aberta, com atenção especial para que o útero não fosse movimentado e o cateter, deslocado.

4.2.4 Ocorrência de lesões de víscera, de vaso e hemorragias

Silva et al (1995) e Valocký et al (2003), ao descreverem a técnica de IA por via laparoscópica na cadela, não relataram a ocorrência de quaisquer complicações intraoperatórias. Contudo, em cirurgias laparoscópicas, embora raras, complicações são passíveis de ocorrer (Cooper, 1995). As complicações relacionadas a esta abordagem incluem aquelas associadas à anestesia geral, ao pneumoperitônio e à inserção da agulha de Veress e do trocarte (Yuzpe, 1990). Essas complicações são raras e geralmente ocorrem durante a curva de aprendizado. Neste sentido, são comuns das gradualmente com o treinamento da equipe cirúrgica com a aplicação de técnica adequada (Zucker et al., 1993). Desta forma,



visando a minimizar tais complicações, foi realizado, no presente estudo, treinamento prévio em caixa de espelhos (oito horas), em cadáveres (oito horas) e em animais vivos (17 horas), totalizando 35 horas.

Lesão de víscera ocorreu em um animal do grupo I (cadela 5). O animal apresentava esplenomegalia acentuada, sendo o baço acometido em sua face visceral durante sua manipulação com a pinça de apreensão para exposição do corpo uterino. Não houve diferença significativa na ocorrência de lesão de víscera entre os grupos ($p = 1$, Teste Exato de Fisher).

As lesões viscerais (bexiga, intestinos, estômago, baço, fígado e ureteres) são consideradas raras. Podem ocorrer durante a introdução cega da agulha de Veress ou do trocarte, durante manobras de dissecação ou pelo uso incorreto do instrumental cirúrgico (Savassi-Rocha, 1995). Geralmente as lesões são discretas, podendo, quando necessário, ser reparadas por laparoscopia. Para minimizar a ocorrência dessas lesões, devem-se considerar os seguintes fatores: jejum alimentar pré-cirúrgico e/ou colocação de sonda orogástrica, cateterismo vesical, posicionamento apropriado da agulha de Veress e elevação do plano músculoaponeurótico, com pinça Backhaus, para inserção do primeiro trocarte (Coelho et al., 1995; De Lisle et al., 1995). No presente trabalho não ocorreram lesões de vísceras como anteriormente citado, mas apenas do baço, decorrente da manipulação deste órgão para exposição uterina.

Lesão de vaso ocorreu em um animal de cada grupo. No grupo I (cadela 9), houve lesão de um vaso da parede uterina durante a punção com cateter, de modo semelhante ao descrito por Silva et al. (1995) e Valocký et al. (2003) e, no grupo II (cadela 7), a pinça de apreensão com dente lesionou um vaso do ligamento largo do útero. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p = 1$, Teste Exato de Fisher).

Ocorreu hemorragia discreta nos casos de lesão de víscera e vaso supracitados, contudo o sangramento cessou espontaneamente, após alguns minutos, em todos os casos. Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais ($p = 1$, Teste Exato de Fisher). A ocorrência de hemorragia discreta durante procedimentos laparoscópicos, geralmente são

decorrentes de lesão de pequenos vasos. Nestes casos, o prognóstico é favorável, visto que o sangramento cessa espontaneamente ou com compressão local (Coelho et al., 1995; De Lesli et al., 1995). No presente trabalho, em ambos os casos de hemorragia, não houve necessidade de compressão local ou uso de eletrocauterização, visto que o sangramento cessou espontaneamente.

4.2.5 Enfisema subcutâneo

O enfisema subcutâneo pode ocorrer durante a insuflação abdominal, pelo posicionamento inadequado da agulha de Veress ou do conjunto trocarte-cânula, levando à insuflação de gás carbônico no espaço subcutâneo. Esta constitui uma complicação menor dos procedimentos laparoscópicos, pois não causa alterações clínicas e o gás é reabsorvido espontaneamente em poucas horas, sem tratamento (Coelho et al., 1995; Cooperman, 1995).

Não foi observado enfisema subcutâneo pelo posicionamento inadequado da agulha de Veress ou do trocarte e sim enfisema na região inguinal, em um animal do G I (animal 8), que apresentava hérnia inguinal bilateral. Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais ($p = 1$, Teste Exato de Fisher). Silva et al. (1995) e Valocký et al. (2003), ao descreverem a técnica de IA por via laparoscópica na cadela, não citam a ocorrência de enfisema subcutâneo de qualquer natureza.

4.3 Avaliação dos custos da inseminação artificial

O material de consumo utilizado para a realização da IA intra-uterina por via laparoscópica está relacionado ao quadro 1. Os valores indicados foram avaliados no período de dezembro de 2007.

Segundo o levantamento de custos realizado, o valor para cada procedimento, para uma cadela de 10 quilogramas peso corporal, foi de R\$ 247,05, incluindo os períodos pré e pós-operatórios imediatos. A IA intra-uterina por via laparoscópica é indicada em programas de manejo reprodutivo, especialmente de animais com alterações anatômicas dos órgãos reprodutivos (Silva et al., 1995) ou que apresentem



dificuldades na monta natural (Silva et al., 2003). Adicionalmente, esta abordagem cirúrgica é mais indicada quando se utiliza sêmen congelado (Silva et al., 1995) ou sêmen de cão oligospermico ou, ainda, quando há interesse em reduzir a dose inseminante sem comprometer a taxa de prenhez, visto que o número de espermatozoides necessários pode ser reduzido

ao se realizar a IA em porções mais craniais do útero (Tsutsui et al., 2003). Neste sentido, considerando-se o alto valor zootécnico dos animais que têm indicação para IA intra-uterina por via laparoscópica, o custo do procedimento, associado ao valor do sêmen congelado, não constitui obstáculo à sua realização.

Quadro 1: Custos gerais (material de consumo, material permanente e taxas), em reais, para uma inseminação artificial, pela abordagem laparoscópica, para um animal de 10 quilos de peso corporal.

CUSTOS GERAIS	Quantidade (unidade)	Preço parcial (RS)	Preço total (RS)
Acepromazina 0,2% (frasco 20 ml)	0,25 ml	13,00	0,16
Camisa para proteção da microcâmara e do cabo de luz (unidade)	02 unid.	1,80	3,60
Cateter BD Insyte® 22 (unidade)	02 unid.	2,50	5,00
Cetoprofeno 10% (frasco 10 ml)	0,3 ml	20,00	0,60
Cloridrato de Petidina (ampola)	01 unid.	1,50	1,50
Equipo (unidade)	01 unid.	0,90	0,90
Escova para anti-sepsia das mãos (unidade)	03 unid.	2,00	6,00
Fio Caprofil agulhado 3-0 (unidade)	01 unid.	8,00	8,00
Fio Mononylon agulhado 3-0 (unidade)	01 unid.	5,00	5,00
Isoflurano (frasco 100 ml)	10 ml	58,00	5,80
Lâmina de bisturi (unidade)	01 unid.	0,40	0,40
Lâmina de tricotomia (unidade)	01 unid.	0,20	0,20
Luvas cirúrgicas (unidade)	03 unid.	0,90	2,70
Propofol (frasco 20 ml)	5,0 ml	3,40	0,85
Seringa 3ml (unidade)	02 unid.	0,22	0,44
Seringa 5ml (unidade)	02 unid.	0,35	0,70
Solução ringer lactato (frasco 500ml)	01 unid.	1,80	1,80
Caixa de instrumental – rotina (unidade)	01 unid.	23,20	23,20
Capote (unidade)	03 unid.	8,10	24,30
Cuba de anti-sepsia (PVPI degermante e tintura de iodo) (unid)	01 unid.	4,50	4,50
Pacote de campos cirúrgicos (unidade)	01 unid.	11,30	11,30
Pacote de compressas (unidade)	01 unid.	2,50	2,50
Exame risco cirúrgico	01	50,00	50,00
Esterilização do instrumental laparoscópico (ciclos)	02	15,00	30,00
Gasto com CO ₂ (litros)	30 L	4,00	120,00
Aluguel de sala cirúrgica (15% do procedimento)		28,50	
Taxa de desgaste do equipamento (15% do procedimento)		28,50	
TOTAL			247,05



4.4 Avaliação da distribuição espermática

A distribuição espermática é influenciada por diversos fatores como: fase do ciclo estral da cadela, método de deposição seminal (monta natural, IA intravaginal ou intra-uterina), tipo de sêmen (fresco, resfriado ou congelado), qualidade espermática (motilidades total e progressiva, e vigor) e respostas individuais de cada animal (Rijsselaere et al., 2004; England et al., 2006). Neste sentido, o momento da IA, as características do sêmen e o tamanho dos animais foram padronizados, de modo a reduzir a variação nas respostas estudadas.

Considerando a fase do ciclo estral, não foram observadas diferenças significativas, entre os grupos, quanto à concentração sérica de progesterona e à presença de corpo lúteo (Tab. 1) (Teste Exato de Fisher – $p = 1$, para progesterona), comprovando que todos os animais foram inseminados na fase ovulatória.

As avaliações de motilidades total e progressiva e vigor espermático também não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Tab. 2) (Mann-Whitney – motilidade total, $p = 0,86$; motilidade progressiva, $p = 0,34$; vigor, $p = 0,32$), confirmando a padronização do sêmen utilizado.

Tabela 1: Dados individuais de concentração de progesterona sérica (ng/ml) no momento da IA e presença (+) ou ausência (-) de corpos lúteos.

Grupos	Cadelas	Progesterona	Corpos Lúteos
I	1	7,67	+
I	3	4,84	+
I	5	3,95	+
I	8	7,45	+
I	9	7,12	+
I	12	6,77	+
Média e Desvio Padrão de GI		6,30 ± 1,53^a	
II	2	4,61	+
II	4	5,94	+
II	6	4,31	+
II	7	4,71	+
II	10	8,55	+
II	11	5,58	+
Média e Desvio Padrão de GII		5,62 ± 1,57^a	

Teste exato de Fisher ($p=1$)



Tabela 2: Valores individuais de motilidades total e progressiva e vigor espermático pós-descongelamento do sêmen utilizado na inseminação artificial no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII).

Grupos	Cadelas	Sêmen		
		Motilidade total	Motilidade progressiva	Vigor
I	1	55	50	3
I	3	55	50	3
I	5	55	50	3
I	8	60	55	3
I	9	60	55	4
I	12	55	50	3
Média e desvio padrão GI		56,67 ± 2,58^a	51,67 ± 2,58^a	3,17 ± 0,41^a
II	2	55	50	3
II	4	55	50	3
II	6	50	45	3
II	7	70	50	3
II	10	60	55	3
II	11	55	50	3
Média e desvio padrão GII		57,5 ± 6,89^a	50 ± 3,16^a	3^a

Teste de Mann-Whitney: motilidade total (p=0,86), motilidade progressiva (p=0,34), vigor (p=0,32).

O momento da IA constitui um ponto crítico na eficiência reprodutiva da espécie canina, especialmente quando se utiliza sêmen congelado. Neste sentido, a literatura descreve vários protocolos. Kim et al. (2007) realizaram IA intra-uterina por laparotomia, em cinco cadelas, com sêmen congelado, na dose de 50×10^6 espermatozoides totais, três dias após a progesterona sérica alcançar concentração de 4 a 7,5 ng/ml, e obtiveram taxa de concepção de 100%. Pretzer et al. (2006) utilizaram o mesmo momento de inseminação, em 137 cadelas, e atingiram 84,3% de prenhez através da técnica transcervical endoscópica, também com sêmen congelado (dose inseminante de 100 a 150×10^6 espermatozoides viáveis). Tsumagari et al. (2003), realizaram IA intravaginal com sêmen congelado (5 ml de sêmen diluído, na dose total de 400×10^6 espermatozoides) em 20 cadelas e determinaram o momento ideal como sendo de cinco a sete dias após o pico de LH (progesterona igual a 2 ng/ml). Desta forma, obtiveram taxas de prenhez de 55% e 80% após única IA (no quinto dia após o pico de LH) ou duas inseminações (nos dias 5 e 7 após o pico de LH), respectivamente. Fontbonne e Badinard (1993) realizaram duas inseminações intra-

uterinas transcervicais, com cateter Norueguês (cateter rígido metálico) e sêmen congelado (132×10^6 espermatozoides viáveis) em 19 cadelas, sendo a primeira IA, com progesterona sérica entre 10 e 15ng/ml e a segunda, 48 horas após, com progesterona até 50 ng/ml, atingindo taxa de prenhez de 73,6%. Diferentemente, England e Concannon (2002) citaram o momento ideal para IA intra-uterina, com sêmen congelado, como sendo um dia após a progesterona sérica ter atingido oito a 10 ng/ml. No presente estudo, que teve como objetivo comparar a distribuição espermática com relação ao sítio de deposição seminal, a IA foi realizada na fase ovulatória (progesterona entre 4 e 8 ng/ml). Esta escolha baseou-se em Rijsselaere et al. (2004), que comparando a quantidade espermática recuperada em três momentos diferentes de IA intravaginal com sêmen fresco (pré-ovulatório, ovulatório e pós-ovulatório), observaram maior número de espermatozoides no trato genital de cadelas quando a IA foi realizada durante o período ovulatório.

Diversos métodos de avaliação da distribuição espermática estão descritos na literatura, em diferentes espécies, e incluem lavagem uterina e



tubárica na coelha (Overstreet e Cooper, 1978), na cabra (Hunter et al., 1980), na cadela (Rijsselaere et al., 2004) e na porca (Sumransap et al., 2007); citologia de mucosa na porca (Lovell e Getty, 1968) e na cabra (Hunter et al., 1980); observação direta por transparência na rata (Suarez, 1987) e na fêmea de hamster (Shalgi et al., 1992); histologia e avaliação por microscopia óptica em porca (Lovell e Getty, 1968), em fêmea de hamster (Smith et al., 1987) e na cadela (Rijsselaere et al., 2004); e por microscopia eletrônica de varredura na cadela (Rijsselaere et al., 2004) e na égua (Bader, 1982 e Boyle et al., 1987). Contudo, a maioria dos trabalhos empregou sêmen fresco, com dose inseminante equivalente a um ejaculado.

A citologia de mucosa uterina foi utilizada, com êxito, por Lovell e Getty (1968) e Hunter et al. (1980) para avaliação do transporte espermático no útero da porca e da ovelha, respectivamente. No presente estudo, o *imprint* das mucosas tubárica (Fig.19) e uterina (Figs. 20 e 21) foi capaz de detectar a presença de espermatozóides nos diversos segmentos uterinos avaliados em todos os animais, mas não foram encontrados espermatozóides na mucosa tubárica de nenhum animal de ambos os grupos.

Poder-se-ia especular se a fase do ciclo estral utilizada para a realização da IA (fase ovulatória – início do aumento da concentração de progesterona plasmática) teria tido alguma influência no transporte espermático até a tuba e/ou na condição de abertura do óstio da tuba uterina, dificultando a entrada dos espermatozóides durante este período. Na revisão de literatura realizada não foi encontrado qualquer apoio a esta especulação. É, contudo, tentador chamar atenção ao fato de que quando da última IA, nos trabalhos acima citados (Fontbonne e Badinand, 1993; England e Concannon, 2002; Tsumagari et al., 2003; Pretzer et al., 2006; Kim et al., 2007) que obtiveram bons resultados de fertilidade, a concentração plasmática de progesterona estava mais elevada do que no presente estudo, além da presença de oócitos maduros ter sido um fato. O quanto a presença destes influenciaria a possibilidade dos espermatozóides atingirem a tuba fica como uma hipótese a ser confirmada. É, no entanto, necessário considerar como causa provável da ausência do achado de espermatozóides na tuba o fato de que, nas cadelas, o reservatório espermático é predominantemente considerado como sendo nas criptas das glândulas endometriais, como citado por Rijsselaere et al. (2004).

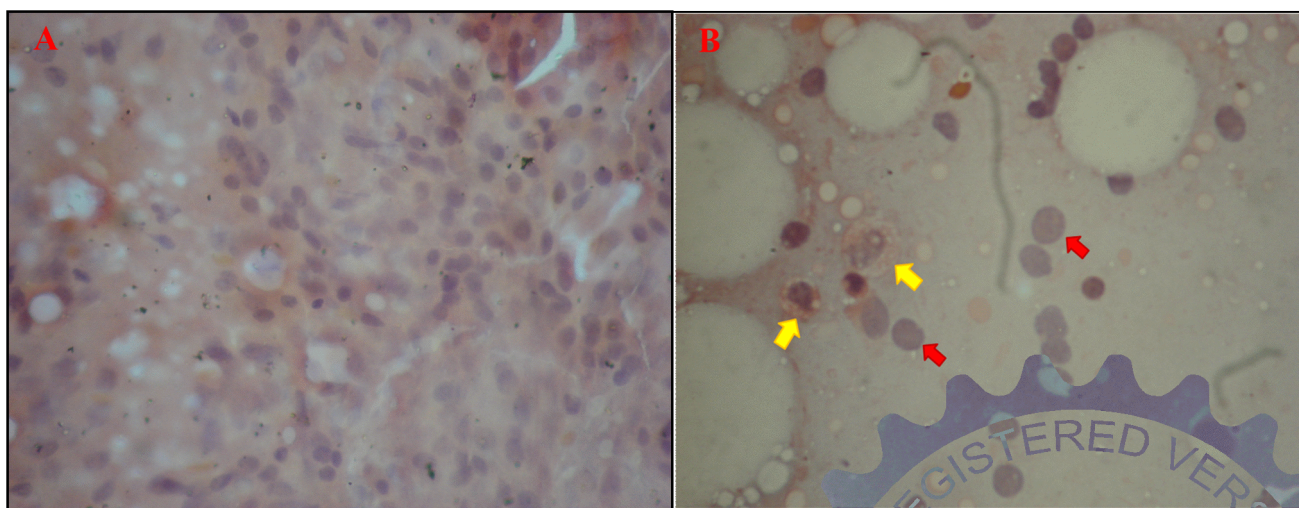


Figura 19: *Imprint* da mucosa tubárica corado pela técnica de Harris-Short, avaliação sob microscopia óptica. Diferentes padrões de celularidade e ausência de espermatozóides. A) células da mucosa tubárica em grande quantidade (150x); B) pequena quantidade de células da mucosa tubárica (setas vermelhas) e polimorfonucleares (setas amarelas) (200x).



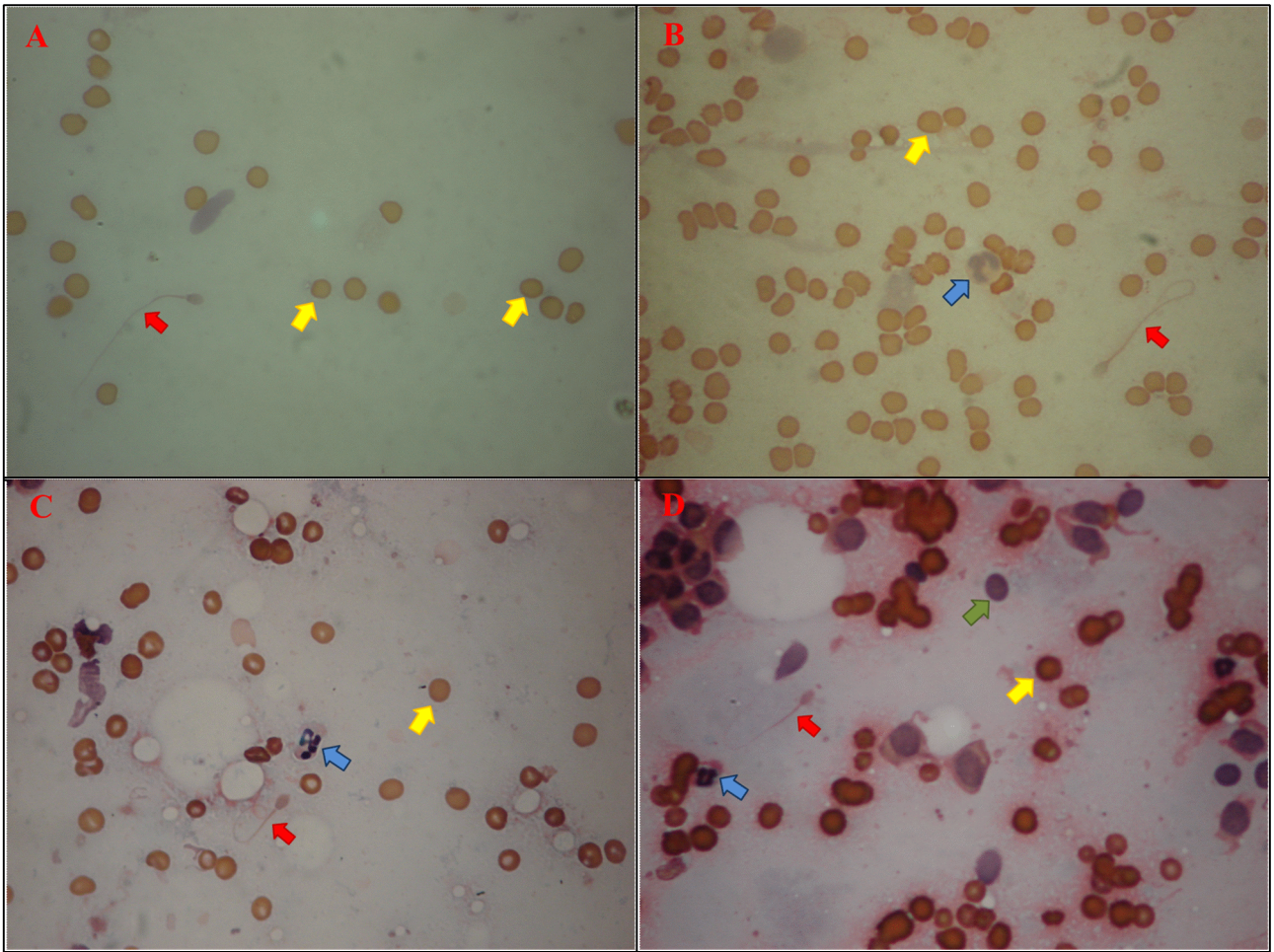


Figura 20: *Imprint* da mucosa uterina corado pela técnica de Harris-Shorr, avaliação sob microscopia óptica. A) hemácias (setas amarelas) e espermatozóide (seta vermelha) (200x); B e C) hemácias (setas amarelas), neutrófilo (setas azuis) e espermatozóide (setas vermelhas) (200x); D). hemácias (seta amarela), neutrófilos (seta azul), células endometriais (seta verde) e espermatozóide (seta vermelha) (230x).

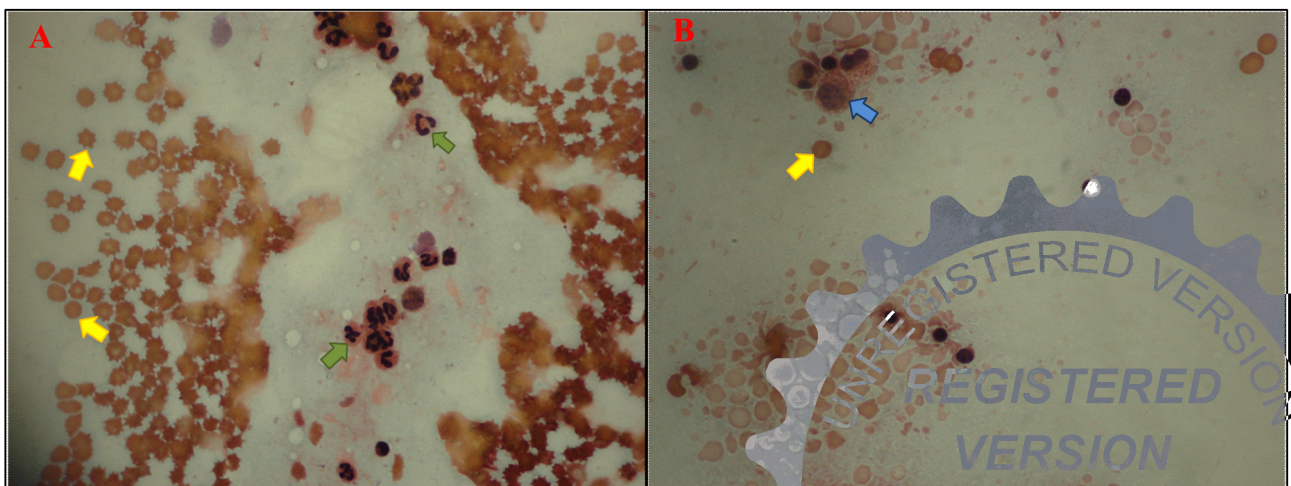


Figura 21: *Imprint* da mucosa uterina corado pela técnica de Harris-Shorr, avaliação sob microscopia óptica. Ausência de espermatozoides. A) grande quantidade de hemácias (setas amarelas) e neutrófilos no centro (setas verdes) (200x). B) hemácias (seta amarela) e monócitos (seta azul) (200x).



Doak et al. (1967), pioneiros no estudo da interação do espermatozóide com o trato genital da cadela, ao estudarem a longevidade espermática nesta espécie, após monta natural, utilizando lavagem e citologia por esmagamento de mucosa, contaram de zero a mais de 500 espermatozóides por citologia e de 0 a 56,8% de glândulas uterinas com espermatozóide. Entretanto, estes mesmos autores encontraram um número consideravelmente menor de espermatozóides na tuba uterina (contagem máxima de 100 espermatozóides 24 horas após a cópula), sendo ausente na maioria dos animais, o que é sugestivo de poder existir um momento em que a entrada dos espermatozóides na tuba da cadela seja facilitada podendo estar associado a um estágio fisiológico específico. Esta dificuldade foi observada também no presente estudo, uma vez que foi possível a contagem de espermatozóides nos diversos segmentos uterinos, mas não na tuba uterina de todos os animais.

De modo semelhante, Rijsselaere et al. (2004), ao estudarem a distribuição espermática na trato genital da cadela através de lavagem uterina e tubárica e de microscopia óptica e eletrônica, observaram diferença significativa na quantidade de espermatozóides entre os vários segmentos uterinos (corpo e cornos uterinos e junção útero-tubárica) e segmentos tubáricos (istmo, ampola e infundíbulo) pelos três métodos de avaliação, 24 horas após IA intravaginal com sêmen fresco, na dose total de 500×10^6 espermatozóides. Apesar de terem observado espermatozóides na tuba uterina após a lavagem, consideraram a possibilidade de alguns destes espermatozóides serem provenientes da junção útero-tubárica, visto que estes segmentos foram lavados concomitantemente. Os mesmos autores sugerem ainda que os espermatozóides presentes na tuba uterina possam não estar firmemente aderidos ao epitélio. Seguindo este raciocínio, o *imprint* da mucosa tubárica realizada no presente estudo deveria ter permitido a observação de, pelo menos, uma pequena quantidade de espermatozóides nesta porção do trato genital da cadela. Como o número de espermatozóides que penetram a junção útero-tubárica é influenciado pela quantidade de espermatozóides vivos neste local (Rijsselaere et al., 2004; England et al., 2006), e visto que a dose inseminante total utilizada no presente estudo (300×10^6 espermatozóides) é baixa quando comparada a

um ejaculado ($719,4 \pm 314,5 \times 10^6$) (Silva et al., 2000), a utilização de um método de avaliação de distribuição espermática mais sensível para a detecção de quantidade espermática mínima talvez fosse capaz de confirmar a presença destas células na tuba uterina. Desta forma, estudos adicionais são necessários.

Ainda sobre a distribuição espermática, Tsutsui et al. (1989), ao estudarem o transporte espermático em cães após monta natural, observaram, através da colocação de lâmina de vidro em uma fístula na extremidade uterina no flanco de cadelas, que o espermatozóide chegava à extremidade do corno uterino em 30 a 60 segundos após a ejaculação. Não existem trabalhos acerca do tempo necessário para a chegada de espermatozóides na tuba uterina de cadelas em quantidade suficiente para a fertilização dos oócitos. Contudo, Bader (1982) e Fiala (2004) avaliaram de forma análoga o transporte espermático no trato genital da égua utilizando três diferentes doses de sêmen congelado (100×10^6 , 500×10^6 e 1000×10^6) em três intervalos de tempo entre a IA e o abate (duas, quatro e 24 horas). Os autores evidenciaram a presença de pequena quantidade de espermatozóides na junção útero tubárica e tuba uterina duas horas após a IA, independente da dose inseminante, mas um número significativamente maior após quatro horas da inseminação. Larsson (1988), estudando a distribuição espermática no trato genital da vaca após IA com sêmen congelado observou a presença de espermatozóides na ampola e no infundíbulo duas horas após a IA. Adicionalmente, Smith et al. (1987) observaram espermatozóides na tuba uterina (istmo e ampola) de hamsters fêmea, uma hora após a monta natural. Neste contexto, considerando que a tuba uterina constitui um dos reservatórios espermáticos da cadela, juntamente com as criptas das glândulas e a tuba uterina, o *imprint* da junção útero-tubárica (Rijsselaere et al., 2004) esperava-se que traça espermatozóides neste local. Assim, o intervalo de três horas entre a IA e a avaliação da distribuição espermática, utilizado no presente estudo, não é considerado suficiente para a formação do reservatório espermático na tuba uterina. Entretanto, não foi confirmado pela técnica do *imprint* de mucosa tubárica.



Todos os estudos acerca da distribuição espermática no cão empregaram sêmen fresco, no entanto, sabe-se que a resposta do útero é diferente em relação ao tipo de sêmen utilizado (Ribeiro et al., 2006). No presente estudo utilizou-se sêmen congelado que, além de ter uma viabilidade menor do que a do sêmen fresco (Silva e Verstegen, 1995; Farstad, 2000), contém, no meio extensor no qual os espermatozóides foram acondicionados,

substâncias que poderiam alterar a velocidade do transporte dos espermatozóides (Shäfer-Somi et al., 2006).

O *imprint* de mucosa uterina permitiu a contagem de espermatozóides em todos os segmentos avaliados. A comparação das médias da contagem de espermatozóides totais do trato genital das cadelas não mostrou diferença significativa entre os grupos (Tab. 3).

Tabela 3: Contagem total de espermatozóides no trato genital de cadela após IA intra-uterina laparoscópica no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII). Método utilizado: *imprint* de mucosa uterina e tubárica.

Grupo	Cadelas	Contagem total de espermatozóides
I	1	127
I	3	76
I	5	87
I	8	144
I	9	145
I	12	102
Média e Desvio Padrão de GI		113,5 ± 29,48 ^a
II	2	186
II	4	162
II	6	87
II	7	160
II	10	111
II	11	198
Média e Desvio Padrão de GII		150,67 ± 43,20 ^a

Teste de Mann-Whitney (p = 0,41)

A quantidade de espermatozóides contados nos nove segmentos uterinos foi baixa em relação à dose inseminante total de 300×10^6 espermatozóides. Para esta observação, deve-se considerar a possibilidade de boa parte dos espermatozóides estarem nos reservatórios espermáticos. Nas cadelas, os espermatozóides ficam armazenados em reservatórios espermáticos representados pelas criptas das glândulas endometriais, que constituem o mais importante reservatório espermático nesta espécie, vindo, em seqüência, a junção útero-tubárica e a tuba uterina, este de menor importância (Rijsselaere et al., 2004; England et al., 2006). Desta forma, é possível que os espermatozóides que estivessem intimamente aderidos às criptas das glândulas não tenham sido detectados pelo *imprint*, reduzindo assim a

contagem dos mesmos. Na monta natural, os espermatozóides são rapidamente distribuídos no trato genital da cadela, em sentido cranial, devido às contrações vaginais e uterinas (England et al., 2006). No caso da IA intra-uterina por via laparoscópica, é provável que as contrações vaginais e uterinas não sejam tão efetivas no processo de distribuição seminal.

.Lovell e Getty (1968) afirmam que, após a monta natural ou IA com sêmen fresco, os espermatozóides são removidos do trato genital da porca através da fagocitose, especialmente por neutrófilos, que entram no útero logo após a IA. No presente trabalho, foi encontrada uma infiltração leucocitária bastante intensa. Ribeiro et al. (2006), ao avaliarem a resposta imune do útero da cadela em três grupos sêmen fresco,



apenas meio diluidor (tris-glicose, com gema de ovo e glicerol); e associação da segunda fração espermática com meio diluidor (sem plasma seminal), concluíram que o plasma seminal apresenta função imunomoduladora, controlando a reação inflamatória uterina, e que o meio diluidor induz a uma resposta inflamatória local. Além disso, estes autores observaram que a própria presença do espermatozóide no útero induziu a um estímulo quimiotático às células polimorfonucleares pela ativação de vias imunológicas, causando aumento em permeabilidade vascular, quimiotaxia, fagocitose, ativação de lipases de membrana e lise de espermatozóides. Neste sentido, é

possível que, três horas após a IA por via laparoscópica com sêmen congelado, a quantidade de espermatozóides tenha se reduzido pela fagocitose. Lovell e Getty (1968) também citam que, em porcas, pode haver remoção espermática por contração uterina. A contração miometral pode ter sido, pelo menos para uma parte dos espermatozóides, a causa de retorno via cérvix, o que foi confirmado pelos achados de citologia vaginal realizada logo após o término da IA (Fig. 22). Fica o questionamento se o refluxo de espermatozóides teria sido maior do que o usual em monta natural, haja vista o tipo de procedimento utilizado para a IA, que pode ter alterado a estimulação e a contração uterinas.

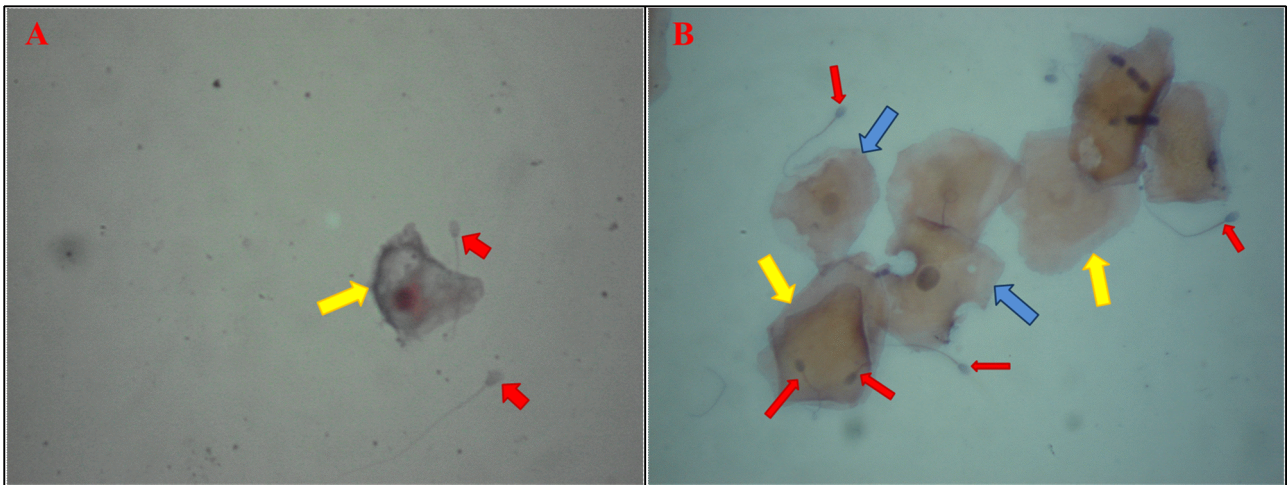


Figura 22: Citologia vaginal realizada 10 minutos após o término da inseminação artificial por via laparoscópica. Retorno de espermatozóides para a vagina, confirmando a deposição do sêmen na luz uterina. A) célula superficial (seta amarela) e dois espermatozóides (setas vermelhas) (200x); B) células superficiais (setas amarelas) e intermediárias (setas azuis) e espermatozóides ao redor (setas vermelhas) (200x).

No presente estudo, realizou-se contagem espermática total e por cm^2 dos nove segmentos do trato genital (Fig. 13A) e procedeu-se a comparação entre os grupos I e II. Na comparação das médias, observou-se diferença significativa na quantidade de espermatozóides apenas no corpo uterino em ambos os métodos de contagem (espermatozóides totais e espermatozóide por cm^2). Nos demais segmentos, esta diferença não foi estatisticamente significativa. As tabelas 4 e 5 demonstram a distribuição espermática total e por cm^2 , respectivamente. Na avaliação dos dados observa-se um aumento progressivo da quantidade de espermatozóides em sentido cranial nos cornos uterinos de ambos os lados nos dois grupos, indicando que a distribuição

espermática ocorreu em todo o trato genital das cadelas. Enfatiza-se que quando houve deposição na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (G II), evidenciou-se presença de espermatozóides na extremidade do corno uterino contralateral. Neste sentido, a distribuição dos espermatozóides com a dose inseminante empregada independe do sítio de deposição. Contudo, estes resultados não puderam ser mais discutidos pela falta de literatura, até o momento, acerca deste aspecto na espécie canina. Este achado mostra que mesmo que o procedimento de IA utilizado não tenha permitido a estimulação de contração uterina mais adequada, esta foi capaz de distribuir os espermatozóides para toda extensão dos cornos. Na contagem de espermatozóides



totais por segmento há uma redução no número de espermatozoides na junção útero-tubárica em ambos os lados. Este fato pode ser justificado pela menor extensão deste fragmento em comparação aos outros segmentos uterinos (Tab. 6). Analisando a contagem de espermatozoides

por cm², a distribuição entre os segmentos foi mais uniforme, mesmo para a junção útero-tubárica. Os anexos 5 e 6 mostram as contagens espermáticas de cada cadela, por segmento, nos grupos I e II, respectivamente.

Tabela 4: Distribuição espermática (contagem total) nos diferentes segmentos do trato genital de cadelas após IA no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII).

Segmentos uterinos e tubáricos	GI	GII	z (Mann-Whitney)
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	
CORPO	6,17 ± 2,56 ^a	1,5 ± 1,05 ^b	0
CORNO D – segmento 1	17,83 ± 10,03 ^a	23,33 ± 13,82 ^a	0,42
CORNO D – segmento 2	19,33 ± 8,98 ^a	34,67 ± 22,89 ^a	0,17
JUT D	7 ± 4,73 ^a	17,17 ± 16,68 ^a	0,23
TUBA D	0 ^a	0 ^a	0,32
CORNO E – segmento 1	18 ± 6,87 ^a	24,33 ± 13,98 ^a	0,38
CORNO E – segmento 2	22,5 ± 11,15 ^a	30,67 ± 20,65 ^a	0,63
JUT E	7,83 ± 3,06 ^a	19 ± 12,88 ^a	0,09
TUBA E	0 ^a	0 ^a	0,32

Médias com letras distintas, na linha, apresentam diferença significativa pelo teste de Mann-Whitney (P<0,05).

Tabela 5: Distribuição espermática por cm² nos diferentes segmentos do trato genital de cadelas após IA no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII).

Segmentos uterinos e tubáricos	GI	GII	z (Mann-Whitney)
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	
CORPO	1,88±0,89 ^a	0,46±0,32 ^b	< 0,05
CORNO D – segmento 1	3,07±1,36 ^a	2,61±1,51 ^a	0,52
CORNO D – segmento 2	3,84±2,03 ^a	3,16±1,89 ^a	0,87
JUT D	3,30±2,46 ^a	4,96±3,95 ^a	0,75
TUBA D	0 ^a	0 ^a	-
CORNO E – segmento 1	3,18±1,77 ^a	3,59±2,72 ^a	1
CORNO E – segmento 2	3,86±2,39 ^a	4±3,63 ^a	0,94
JUT E	5,69±6,38 ^a	6,43±6,09 ^a	0,94
TUBA E	0 ^a	0 ^a	-

Médias com letras distintas, na linha, apresentam diferença significativa pelo teste de Mann-Whitney (P<0,05).



Tabela 6: Área, em cm², dos diferentes segmentos do trato genital de cadelas utilizadas para os grupos I e II (média e desvio padrão).

Grupos	Corpo	Corno 1E	Corno 2E	JUTE	Tuba E	Corno 1D	Corno 2D	JUTD	Tuba D
I	3,56±1,31	8,12±4,06	7,07±2,35	1,99±0,81	3,25±1,02	8,22±3,40	7,27±2,45	2,18±0,41	2,92±0,88
II	3,58±0,74	9,55±5,47	9,81±3,12	3,58±1,01	5,02±3,16	15,01±15,82	10,97±3,80	3,28±0,89	3,28±0,74

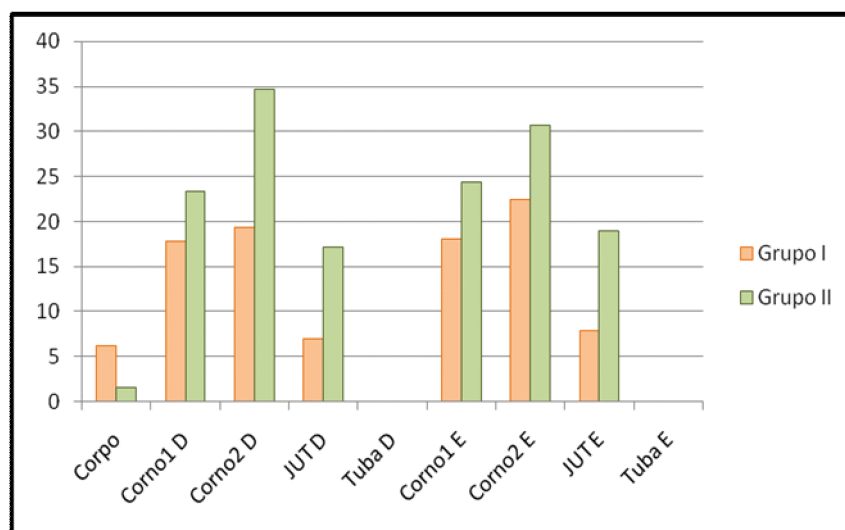


Figura 23: Distribuição espermática (contagem total) após IA no corpo do útero (GI) e na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII), nos diferentes segmentos genitais.

Apesar da ausência de diferença significativa, foi observada acentuada variação na contagem de espermatozoides entre os segmentos uterinos avaliados (Fig. 25). A menor quantidade de espermatozoides no corpo do útero em relação aos demais segmentos diferiu de Tsutsui et al. (1989), que utilizaram monta natural. Estes autores, apesar de terem comprovado a rápida distribuição espermática (30 a 60 segundos), em sentido cranial, no trato genital, observaram a presença de maior quantidade de espermatozoides na vagina do que na extremidade cranial do corno uterino das cadelas. Este fato pode ser explicado pela ocorrência de maior perda seminal por refluxo quando se emprega monta natural ou IA intravaginal com sêmen fresco. Como, no presente trabalho, a deposição seminal foi realizada no ambiente intra-uterino, a perda espermática pode ter sido menor.

No presente estudo, esta ampla variação de contagem espermática nos diferentes segmentos uterinos avaliados pode ser devida ao fato do

imprint de mucosa ser um método com limitações para avaliação quantitativa, dada a dificuldade de padronização da pressão exercida em cada segmento durante a sua realização. Este método de avaliação pode não ter permitido a contagem celular em todos os campos, pois com a variação na espessura da citologia, áreas com alta celularidade (hemácias, células endometriais e polimorfonucleares) impediriam a contagem de espermatozoides que pudessem estar sob outras células. A escolha do *imprint* de mucosa para a avaliação da distribuição espermática no estudo em questão baseou-se em avaliações preliminares e na literatura consultada (Lovell e Getty, 1968 e Hunter et al., 1980). Nas avaliações preliminares, a lavagem e as histologias uterina e tubárica permitiram observar que três métodos de avaliação não detectavam a presença de espermatozoides tanto no lúmen uterino quanto tubárico após a dose com sêmen congelado, na dose inseminante total de 300×10^6 espermatozoides. Por outro lado, a citologia por *imprint* permitiu a contagem destas células em diversos segmentos do trato genital.



sendo então, o método escolhido para avaliação da distribuição espermática.

O transporte e a sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo da fêmea têm sido estudados extensivamente, especialmente em bovinos (Larsson, 1988; Suarez et al., 1997), suínos (Mburu et al., 1996; Mburu et al., 1997; Kacoket et al., 2002; Langendijk et al., 2002), eqüinos (Bader, 1982; Fiala, 2004) e outras espécies animais (Krishna e Dominic, 1978; Ito et al., 1991; Smith e Yanagimachi, 1991; Taggart e Temple-Smith, 1991; Taggart et al., 1999). Embora os mecanismos envolvidos sejam complexos, o transporte espermático nos mamíferos parece ser um processo dinâmico e altamente controlado, resultando na chegada do espermatozóide no sítio de fertilização, simultaneamente com a liberação de oócitos férteis (England e Pacey, 1998). Contudo nos cães, os estudos sobre a distribuição e sobrevivência espermática no trato reprodutivo da cadela ainda são limitados e carecem de maiores informações.

5. CONCLUSÕES

- ◆ A inseminação artificial por via laparoscópica é um procedimento viável em cadelas;
- ◆ O cateter 22-G é adequado para deposição de sêmen na IA intra-uterina por via laparoscópica tanto no corpo uterino quanto na extremidade do corno uterino esquerdo;
- ◆ O acesso à extremidade cranial do corno uterino esquerdo para deposição seminal apresenta maiores dificuldades que a deposição no corpo do útero devido à presença do baço e de segmentos intestinais que recobrem a extremidade deste corno;
- ◆ A IA intra-uterina por via laparoscópica, no corpo do útero, com sêmen congelado, na dose total de 300×10^6 espermatozóides e durante a fase ovulatória, permite a distribuição espermática até a extremidade cranial de ambos os cornos uterinos.
- ◆ A IA intra-uterina por via laparoscópica, na extremidade cranial do corno uterino

esquerdo, com sêmen congelado, na dose total de 300×10^6 espermatozóides e durante a fase ovulatória, permite a distribuição espermática até a extremidade cranial do corno uterino contralateral.

- ◆ A IA por via laparoscópica apresenta custo acessível em cadelas;
- ◆ O *imprint* de mucosa demonstrou ser um método pouco sensível para detecção de espermatozóides descongelados na dose total de 300×10^6 , constituindo um método qualitativo de avaliação de distribuição espermática.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchtygien*, v.10, p.1-4, 1975.

ARTHUR, G.H.; NOAKES, D.E.; PEARSON, H. Normal sexual apparatus. In: ARTHUR, G.H.; NOAKES, D.E.; PEARSON, H. *Veterinary reproduction and obstetrics*. 6ed. London: Baillière Tindall, 1983. p.509-524.

ASA, C.S.; BAUMAN, K.; CALLAHAN, P. et al. GnRH-agonist induction of fertile estrus with either natural mating or artificial insemination, followed by birth of pups in gray wolves (*Canis lupus*). *Theriogenology*, v. 66, p. 1778-1782, 2006.

BADER, H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.32, p.59-64, 1982.

BANDINAND, F.; FONTBONNE, A.; MAUREL, M.C. et al. Fertility in the bitch in relation to the concentration of oestradiol, progesterone and lutealizing hormone and vaginal smears. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement, v.47, p.63-67, 1993.

BOUCHA, G.F.; GOSWAMI, G.; GANLEY, V.K. et al. Estrus induction in the bitch with the synthetic progestogen diethylstilbestrol. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.47, p.515-517, 1993.



BRUN, M.V. *Ovário-histerectomia em caninos por cirurgia laparoscópica*. 1999. 181p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Cirurgia Experimental) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CHIRINÉA, V.H. *Efeito do meio de congelamento sobre as características morfofuncionais do sêmen canino*. 2004. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

COELHO, J.C.U.; MARCHESINI, J.B.; WIEDERKEHR, J.C. Complicações gerais em videocirurgia. In: COELHO, J.C.U.; MARCHESINI, J.B.; MALAFAIA, O. (Eds.). *Complicações da videocirurgia: da profilaxia ao tratamento*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1995. Cap.4, p.27-47.

COOPERMAN, A.M. Complications of laparoscopic surgery. In: ARREGUI, M.E.; FITZGIBBONS, R.J.; KATKHOUDA, N. et al. *Principles of Laparoscopic Surgery – Basic and Advances Techniques*. New York: Springer-Verlag, 1995. cap. 7: p.71-77.

CONCANNON, P.; LASLEY, B.; VANDERLIP, S. LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dogs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.51, p.41-54, 1997.

CONCANNON, P.W.; MACCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl. 39, p.3-25, 1989.

CREMONESI, F.; SALAMON, L.; GROPPETTI, D. et al. Results of a single transcervical endoscopic insemination using frozen semen in the bitch. *Veterinary Research Communications*, v.29, suppl. 2, p.187-189, 2005.

DE LISLE, N.P.; JACKSON, K.D.; PASCHALL, V. et al. The team: nursing's perspective. In: ARREGUI, M.E.; FITZGIBBONS, R.J.; KATKHOUDA, N. et al. *Principles of Laparoscopic Surgery – Basic and*

Advances Techniques. New York: Springer-Verlag, 1995. cap 9: p.91-100.

DOAK, R.L.; HALL, A.; DALE, H.E. Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.13, p.51-58, 1967.

ENGLAND, G.C.W.; BURGESS, C. Survival of dog spermatozoa within the reproductive tract of the bitch. *Reproduction in Domestic Animals*, v.38, p.325-326, 2003.

ENGLAND, G.C.W.; BURGESS, C.M.; FREEMAN, S.L. et al. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. *Theriogenology*, v.66, p.1410-1418, 2006.

ENGLAND, G.; CONCANNON, P.W. Determination of the optimal breeding time in the bitch: Basic considerations. In: *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca. NY, 2002 Disponível em: www.ivis.org. Acessado em: 02/05/2006.

ENGLAND, G.C.W.; PACEY, A.A. Transportation and interaction of dog spermatozoa within the reproductive tract of the bitch: comparative aspects. In: Linde-Forsber, C. *Advances in Canine Reproduction*, SLU Service Reproduction, Uppsala, 1998, p.624-625.

FARSTAD, W; ANDERSEN-BERG, K. Factors influencing insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 39, p.289-292, 1989.

FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, v. 53, n. 1, p. 175-186, 2000.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 2ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996. 1089p.

FIALA, S.M.E. *Transporte espermático e resposta inflamatória na égua após inseminação com diferentes concentrações de espermatozoides*. 2003. 73p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.



FOLTYNECK, V.; GHELLER, V.A.; MALM, C. et al. Diagnóstico e tratamento por videolaparoscopia da síndrome do ovário remanescente. In: *IV Conferência Sul Americana de Medicina Veterinária*, 2004, Rio de Janeiro, 2004.

FONTBONNE, A.; BADINAND, F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 47, p.325-327, 1993.

FRAZE, R.C.; ROBERTS, J.W.; OKESON, G.C. et al. Open versus laparoscopic cholecystectomy. A comparison of postoperative pulmonary function. *Annals of Surgery*, v.213, n.6, p.651-654, 1991.

GRAVES, H.A.; BALLINGER, J.F.; ANDERSON, W.J. Appraisal of laparoscopic cholecystectomy. *Annals of Surgery*, v.213, n.6, p.655-664, 1991.

GUNAY, A.; GUNAY, U.; SOYLU, M.K. Cabergoline applications in early and late anoestrus periods on German Shepherd dogs. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v.11, n.155, p.557-560, 2004.

HARROP, A.E. Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Veterinary Record*, v. 110, p.194-196, 1954.

HUNTER, R.H.F.; NICHOL, R.; CRABTREE, S.M. Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. *Reproduction Nutrition Development*, v.20, n.6, p. 1869-1875, 1980.

ISHISAKI, Y., BANDAI, Y., SHIMOMURA, K., et al. Safe intraabdominal pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum during laparoscopy surgery. *Surgery*, v.114, n.3, p.549-554, 1993.

ITO, M.; SMITH, T.T.; YANAGIMACHI, R. Effect of ovulation on sperm transport in the hamster oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.93, p.157-163, 1991.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars. Veterinaria*, v. 10, n. 2, p. 156-165, 1994.

JEFFCOATE, I.A.; LINDSAY, F.E.F. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentration vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 39, p.277-287, 1989.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. *Canine and Feline Theriogenology*. 1ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. 592p.

KAEOKET, K.; PERSSON, E.; DALIN, A.M. The influence of pre- and post-ovulatory insemination on sperm distribution in the oviduct, accessory sperm to the zona pellucid, fertilization rate and embryo development in sows. *Animal Reproduction Science*, v.71, p.239-248, 2002.

KIM, H.J.; OH, H.J.; JANG, G. et al. Birth of puppies after intrauterine and intratubal insemination with frozen-thawed canine semen. *Journal of Veterinary Science*, v.8, n.1, p.75-80, 2007.

KRISHNA, A.; DOMINIC, C.J. Storage of spermatozoa in the female genital tract of the vesperilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.54, p.319-321, 1978.

KUSUMA, P.S.; TAINURIER, D. Comparison of induction of oestrus in dogs using metergoline, metergoline plus human chorionic gonadotrophin, or pregnant mares' serum gonadotrophin. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.47, p.363-370, 1993.

KUTZLER, M.A. Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology*, v.64, n.3, p.766-775, 2005.

KUTZLER, M. Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology*, v.68, p.354-374, 2007.

LANGEN, P.; BOGMIN, R.; KIDSON, J. et al. Role of myometrial activity in sperm transport through the uterine tube in fertilization in sows. *Reproduction*, v.123, p.683-690, 2002.



LARSSON, B. *Distribution of spermatozoa in the bovine genital tract after artificial insemination*. 1988. 57p. Thesis (Doctor Degree) – Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America – Small Animal Science*, v. 21, n. 3, 1991.

LINDE-FORSBERG, C. Intra-uterine insemination in the dog using the Scandinavian trans-cervical catheter and a comparison with other methods. In: *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca, NY, 2001. Disponível em: www.ivis.org. Acessado em: 02/05/2006.

LINDE-FORSBERG, C.; HOLST, B.S.; GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs. intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. *Theriogenology*, v.52, n.1, p.11-23, 1999.

LOVELL, J.E.; GETTY, R. Fate of semen in the uterus of the sow: histologic study of endometrium during the 27 hours after natural service. *American Journal of Veterinary Research*, v.29, n.3, p.609-625, 1968.

MALM, C.; ROCHA, P.R.S.; GHELLER, V.A et al. Inseminação intra-uterina pela técnica videolaparoscópica na cadela. In: IV Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 2000, Goiânia. *Anais do IV Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária*. 2000, p.162-162.

MALM, C.; SAVASSI-ROCHA, P.R.; GHELLER, V.A. et al. Ovário-histerectomia: estudo experimental comparativo entre as abordagens laparoscópica e aberta na espécie canina. Intra-operatório I. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.4, p.457-466, 2004.

MBURU, J.N.; EINARSSON, S.; LUNDEHEIM, N. et al. Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. *Animal Reproduction Science*, v.45, p.109-121, 1996.

MBURU, J.N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EINARSSON, S. Changes in sperm ultrastructure and localisation in the porcine oviduct around ovulation. *Animal Reproduction Science*, v.47, p.137-148, 1997.

MINAMI, S.; OKAMOTO, Y.; EGUCHI, H. et al. Successful laparoscopy assisted ovariohysterectomy in two dogs with pyometra. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.59, n.9, p.845-847, 1997.

NEZHAT, C.; NEZHAT, F.; NEZHAT, C.H. et al. Videolaseroscopy and videolaparoscopy. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v.8, n.4, p.851-864, 1994.

OLIVEIRA, E.C.S; JULIANI, G.C.; HENRY, M. et al. Viabilidade *in vitro* do sêmen canino submetido à congelamento com diferentes diluidores e crioprotetores. *Revista brasileira de reprodução animal*, v. 27, n. 3, p. 363-365, 2003.

OVERSTREET, J.W.; COOPER, G.W. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: I. The rapid transit phase of transport. *Biology of Reproduction*, v.19, p.101-114, 1978.

PRETZER, S.D.; LILLICH, R.K.; ALTHOUSE, G.C. Single, transcervical insemination using frozen-thawed semen in the Greyhound: a case series study. *Theriogenology*, v.65, n.6, p.1029-1036, 2006.

RIBEIRO, A.P.; VICENTE, W.R.R.; APPARÍCIO, M. et al. Uterine leucocyte infiltration after artificial insemination in bitches. *Theriogenology*, v.66, p.1462-1464, 2006.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; VAN CRUCHTEN, S. et al. Sperm distribution in the genital tract of the bitch following artificial insemination in relation to the time of ovulation. *Reproduction*, v.128, p.801-811, 2004.

ROTA, A.; MOLLO, A.; MARINELLI, L. et al. Evaluation of cabergoline e buserelin efficacy for oestrous induction in the bitch. *Reproduction in Domestic Animals*, v.38, n.6, p.440-443, 2003.

SAVASSI-ROCHA, P.R. Colectistectomia videolaparoscópica: um novo padrão ouro? In: CASTRO, L.P.; SAVASSI-ROCHA, P.R.; CUNHA-MELC, J.R. *Tópicos em*



Gastroenterologia 5. Rio de Janeiro: Medsi, 1994. cap. 26: p.465-489.

SAVASSI-ROCHA, P.R. Colectistectomia. In: CASTRO, L.P.; MARCHESINI, J.B.; MALAFAIA, O. *Complicações da videocirurgia – da profilaxia ao tratamento*. Rio de Janeiro: Medsi, 1995. cap. 13: p.183-241.

SCOTT, M.A. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, n.1-3, p.337-348, 2000.

SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *Artificial Insemination Digest*, v.17, p.6-7, 1969.

SHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E. et al. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, p.173-182, 2006.

SHALGI, R.; SMITH, T.; YANAGIMACHI, R. A quantitative comparison of the passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction. *Biology of Reproduction*, v.46, p.419-424, 1992.

SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B. et al. Comparisons of intravaginal and intra-uterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *The Veterinary Record*, v.17, n.138, p.154-157, 1996.

SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; SNAPS, F. et al. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology*, v.43, n.3, p.615-623, 1995.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de côco. *Ciência Rural*, v.30, n.6, p.1021-1025, 2000.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, n. 98, p.53-60, 2003.

SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v.44, n.4, p.571-579, 1995.

SMITH, T.T.; KOYANAGI, F.; YANAGIMACHI, R. Distribution and number of spermatozoa in the oviduct of the golden hamster after natural mating and artificial insemination. *Biology of Reproduction*, v.37, p.225-234, 1987.

SMITH, T.T.; YANAGIMACHI, R. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.91, p.567-573, 1991.

STONE, E.A.; CANTRELL, C.G.; SHARP, N.J.H. Ovário e útero. In: SLATTER, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*, 2ª ed. v.2. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1998. cap. 93, p.1540-1558.

STORNELLI, M.A.; STORNELLI, M.C.; ARAUZ, M.S. et al. Comparison of different concentrations of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. In: EUROPEAN VETERINARY SOCIETY FOR SMALL ANIMAL REPRODUCTION, 3, 2002. Bélgica. *Proceedings*...Liège: Bélgica. 2002. p. 174-175.
SUAREZ, S.S. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: Observations in situ. *Biology of Reproduction*, v.36, p.203-210, 1987.

SUAREZ, S.S.; BROCKMAN, K.; LEFEBVRE, R. Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction*, v.56, p.17-21, 1997.

SUMRANSAP, P.; KUNAVONGKED, S. Sperm distribution in the reproductive tract of sows after intrauterine insemination. *Reproduction of Domestic Animals*, v.42, n.2, p.133-137, 2007.

TAGGART, D.A.; SHIVERS, J.A.; MCCLOUGH, P. et al. Timing of mating, sperm dynamics and ovulation in a wild population of agile wallabies (*Marsupialia: Dasyuridae*). *Biology of Reproduction*, v.60, p.282-289, 1999.



- TAGGART, D.A.; TEMPLE-SMITH, P.D. Transport and storage of spermatozoa in the female reproductive tract of the brown marsupial mouse, *Antechinus stuartii* (Dasyuridae). *Journal of Reproduction and Fertility*, v.93, p.97-110, 1991.
- THURMON, J.C.; TRANQUILLI, W.J.; BENSON, G.J. *Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia*, 3^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. 928p.
- TSUTSUI, T.; HORI, T.; KIRIHARA, N. et al. Intratubal insemination with fresh semen in dogs. *Japanese Veterinary Medical Science*, v.65, n.5, p.659-661, 2003.
- TSUTSUI, T.; KAWAKAMI, E.; MURAO, I. et al. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: Observations through uterine fistula. *Japanese Journal of Veterinary Science*, v.51, n.3, p.560-565, 1989.
- TSUMAGARI, S.; ICHIKAWA, Y.; TORIUMI, H. et al. Optimal timing for canine artificial insemination with frozen semen and parentage testing by microsatellite markers in superfecundity. *Japanese Veterinary Medical Science*, v.65, n.9, p.1003-1005, 2003.
- VALOCKÝ, I.; KRAJNÍČKOVÁ, M.; MOJŽIŠOVÁ, J. et al. Laparoscopic intrauterine insemination of bitches. *Folia Veterinaria*, v.47, n.3, p.117-120, 2003.
- VANNUCCHI, C.I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S.E.C. Avaliação seminal em cães. Aspectos práticos. *Clínica Veterinária*, n.15, p.22-26, 1998.
- VANNUCCHI, C.I.; SANTOS, S.E.C.; VISINTIN, J.A. In vitro viability of canine spermatozoa frozen in tris-fructose-citric acid extender with ethylene glycol. *Brazilian Journal of Veterinary Research in Animal Science*, v. 36, n. 4, p. 205-211, 1999.
- VOLKMANN, D.H.; KUTZLER, M.A.; WHEELER, R. et al. The use of deslorelin implants for the synchronization of estrous in diestrous bitches. *Theriogenology*, v. 66, p. 1497-1501, 2006.
- WANKE, M.M.; FARINA, J.; LOZA, M.H. et al. Induction of estrus in bitches with normal and persistent anestrus using human menopausal gonadotropin (hMG). *Theriogenology*, v.47, n.4, p.935-942, 1997.
- WILDT, D.E. Laparoscopy. In: BURKE, T.J. *Small Animal Reproduction and Infertility. A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment*. 1^a ed. Philadelphia: Lea&Febiger, 1986. Cap.2, p.121-140.
- WILSON, M.S., Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 47, p.307-311, 1993.
- WILSON, M.S., Endoscopic transcervical insemination in the bitch. In: *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca, NY, 2003 Disponível em: www.ivis.org. Acessado em: 02/05/2006.
- YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M. et al. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, v. 54, n.4, p. 579-585, 2000.
- YUZPE, A.A. Pneumoperitoneum needle and trocar injuries in laparoscopy. A survey on possible contributing factors and prevention. *The Journal of Reproductive Medicine*, v.35, n.5, p.485-490, 1990.
- ZÖLDÁG, L.; FEKETE, S.; CSÁKY, I. et al. Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology*, v.55, n. 8, p.1657-1666, 2001.
- ZUCKER, K.A.; BAILEY, R.W.; GRAHAM, S.M. Training for laparoscopic surgery. *World Journal of Surgery*, v.17, n.1, p.3-7, 1993.



ANEXOS





Anexo 1: Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 130/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Estudo comparativo da distribuição de sêmen congelado no trato genital da cadela após inseminação artificial intra-uterina laparoscópica em três diferentes sítios de inseminação**", que tem como responsável **Christina Malm**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 11/2006**.

Este certificado expira-se em **22/ 11 / 2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 130/2006**, related to the project entitled "**Study of the viability of laparoscopic artificial insemination with frozen semen in the bitch**", under the supervision of **Christina Malm**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **November 22, 2006**.

This certificate expires in **November 22, 2011**.

Belo Horizonte, 27 de Novembro de 2006.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil.
Telefone: (31) 3499-4516 -- Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bi/etica/cetea - cetea@crpe.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)



Anexo 2: Quadro de avaliação seminal para cada momento de coleta e congelamento de sêmen.

AVALIAÇÃO SEMINAL

Data do congelamento:
Volume de sêmen (2º fração):
Concentração de espermatozoides:
Motilidade espermática pré-congelamento Motilidade total: Motilidade progressiva: Vigor:
Motilidade espermática pós-descongelamento Motilidade total: Motilidade progressiva: Vigor:
Meio diluidor:
OBS.:



Anexo 4: Quadro de avaliação da inseminação artificial por via laparoscópica

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Nome:	Peso:	
Data:	Sêmen:	Progesterona:
Início:	Momento da IA:	Término:
Duração do procedimento:		
Equipe:		
Anestesia:		
Complicações anestésicas:		
Quantidade inseminada:		
Local de inseminação:		
Observações & Complicações: Visibilização e manipulação uterina: Aspecto do útero: Introdução da agulha: Introdução do sêmen: Lesão de vaso: Lesão de víscera: Hemorragia: Enfisema subcutâneo:		

Dimensões uterinas e Outras observações:



Anexo 5: Distribuição espermática individual (contagem total), nos nove segmentos do trato genital das cadelas após IA intra-uterina laparoscópica no corpo do útero (GI).

Cão	Segmentos uterinos e tubáricos	Contagem espermática	Cão	Segmentos uterinos e tubáricos	Contagem espermática
1	corpo	4	1	cornos E - segmento 1	29
3	corpo	10	3	cornos E - segmento 1	15
5	corpo	4	5	cornos E - segmento 1	20
8	corpo	7	8	cornos E - segmento 1	17
9	corpo	8	9	cornos E - segmento 1	8
12	corpo	4	12	cornos E - segmento 1	19
1	cornos D - segmento 1	18	1	cornos E - segmento 2	36
3	cornos D - segmento 1	13	3	cornos E - segmento 2	15
5	cornos D - segmento 1	14	5	cornos E - segmento 2	16
8	cornos D - segmento 1	37	8	cornos E - segmento 2	33
9	cornos D - segmento 1	8	9	cornos E - segmento 2	8
12	cornos D - segmento 1	17	12	cornos E - segmento 2	27
1	cornos D - segmento 2	32	1	JUT E	4
3	cornos D - segmento 2	10	3	JUT E	7
5	cornos D - segmento 2	24	5	JUT E	6
8	cornos D - segmento 2	21	8	JUT E	13
9	cornos D - segmento 2	8	9	JUT E	8
12	cornos D - segmento 2	21	12	JUT E	9
1	JUT D	4	1	Tuba E	0
3	JUT D	6	3	Tuba E	0
5	JUT D	3	5	Tuba E	0
8	JUT D	16	8	Tuba E	0
9	JUT D	8	9	Tuba E	0
12	JUT D	5	12	Tuba E	0
1	Tuba D	0			
3	Tuba D	0			
5	Tuba D	0			
8	Tuba D	0			
9	Tuba D	0			
12	Tuba D	0			



Anexo 6: Distribuição espermiática individual (contagem total), nos nove segmentos do trato genital das cadelas após IA intra-uterina laparoscópica na extremidade cranial do corno uterino esquerdo (GII).

Cão	Segmentos uterinos e tubáricos	Contagem espermiática	Cão	Segmentos uterinos e tubáricos	Contagem espermiática
2	corpo	1	2	cornos E - segmento 1	10
4	corpo	2	4	cornos E - segmento 1	42
6	corpo	0	6	cornos E - segmento 1	12
7	corpo	1	7	cornos E - segmento 1	21
10	corpo	3	10	cornos E - segmento 1	20
11	corpo	2	11	cornos E - segmento 1	41
2	cornos D - segmento 1	42	2	cornos E - segmento 2	12
4	cornos D - segmento 1	14	4	cornos E - segmento 2	56
6	cornos D - segmento 1	15	6	cornos E - segmento 2	30
7	cornos D - segmento 1	38	7	cornos E - segmento 2	13
10	cornos D - segmento 1	8	10	cornos E - segmento 2	17
11	cornos D - segmento 1	23	11	cornos E - segmento 2	56
2	cornos D - segmento 2	65	2	JUT E	9
4	cornos D - segmento 2	10	4	JUT E	30
6	cornos D - segmento 2	12	6	JUT E	14
7	cornos D - segmento 2	58	7	JUT E	3
10	cornos D - segmento 2	29	10	JUT E	21
11	cornos D - segmento 2	34	11	JUT E	37
2	JUT D	47	2	Tuba E	0
4	JUT D	8	4	Tuba E	0
6	JUT D	4	6	Tuba E	0
7	JUT D	26	7	Tuba E	0
10	JUT D	13	10	Tuba E	0
11	JUT D	5	11	Tuba E	0
2	Tuba D	0			
4	Tuba D	0			
6	Tuba D	0			
7	Tuba D	0			
10	Tuba D	0			
11	Tuba D	0			

