

Sabrina Pereira Macedo

**Inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por
endoscopia em cadelas da raça Retriever do Labrador
(Dissertação de Mestrado)**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Christina Malm

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2009

M141i

Macedo, Sabrina Pereira, 1982 –

Inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em cadelas da raça Retriever do Labrador / Sabrina Pereira Macedo. – 2009.
69 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. Sêmen – Teses. 4. Endoscopia – Teses. I. Malm, Christina. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.708 926

“Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas”.
Luiz Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e por estar sempre ao meu lado, iluminando o meu caminho, me abençoando e protegendo.

Aos meus pais, Ridomar e Zélia, meus exemplos de vida, amor e honestidade, pelo incentivo e apoio incondicionais, por tornarem possível a realização de mais uma etapa da minha formação profissional. Agradeço também pelas orações e pelo carinho, pois, mesmo à distância, me fizeram perceber que estiveram o tempo todo aqui comigo. Agradeço também por, nos momentos de dificuldade, se fazerem presentes, ajudando até mesmo na execução de parte do experimento. Ao meu irmão, Fábio, pelo estímulo e atenção.

Ao Daniel, pelo amor, pela presença constante, especial atenção e incentivo, pela paciência (quanta paciência), por me confortar e enxugar minhas lágrimas nos momentos difíceis e por dividir comigo tantos momentos de felicidade. Sem você, essa caminhada não teria sido a mesma.

Às minhas irmãs, Thalita e Tatiana, pela amizade, pela paciência e por permitirem que eu me sinta em casa.

À minha família, que mesmo à distância, torceu por mim e aplaudiu cada passo da minha caminhada.

À Prof^ª. Christina Malm, pela orientação, disponibilidade e apoio durante todo o Mestrado e na elaboração e execução deste trabalho. Gostaria de expressar aqui a minha admiração e gratidão.

Aos amigos e colegas Fabíola, Luis Flávio, Mariana Figueiredo, Mariana Neves, Marcela, Artur, Ana Beatriz, Renato, e Rebeca, pela imensurável ajuda, amizade, companheirismo, aprendizado e paciência, e por tornarem a convivência mais agradável e até mesmo divertida e o trabalho mais descontraído e prazeroso. Por estarem presentes sempre que possível, até mesmo nos fins de semana, afinal, domingo é dia de inseminação...

Ao colega de pós-graduação Guilherme, pela realização das ultra-sonografias e por estar sempre disponível quando solicitado. Muito obrigada.

Ao Daniel e Aléxia, proprietários do Canil Zuo's, por terem aberto as portas do canil e terem cedido os animais para a execução do experimento. Muito obrigada pela confiança e pela grande ajuda!

À Silvia, do Canil Zuo's, por estar sempre disposta a ajudar e por ter sido uma companhia agradabilíssima.

À UFMG, especialmente à Escola de Veterinária e aos professores dessa instituição, pela acolhida e pela oportunidade.

Aos professores Valentim Arabicano Gheller, Maria Denise Lopes e Marc Roger Jean Marie Henry, membros da banca de avaliação, pela disponibilidade e contribuição na etapa final deste

trabalho, especialmente ao professor Valentim, diretor do Hospital Veterinário da UFMG, por disponibilizar o espaço físico para realização deste trabalho.

Aos funcionários do Hospital Veterinário, em especial, Carlos, Terezinha, Dorinha, Elizete, Valéria, Mércio, Joaquim, Creide e Ronaldo, pelo apoio, auxílio e por tornarem possível a realização do nosso trabalho.

Ao CNPq, pela oportunidade da bolsa de estudos no segundo ano do curso.

À FAPEMIG, pelo financiamento de parte dessa pesquisa, disponibilizando o recurso para a compra do equipamento e pagamento de parte das dosagens de progesterona.

À Coloplast do Brasil[®], pela doação dos cateteres utilizados na fase experimental.

Aos cães que participaram do experimento, meu respeito e agradecimento pela existência e por serem o motivo do nosso trabalho e aprendizado. Obrigada por colaborarem com tanta boa vontade, e por terem sido meus companheiros durante toda a execução da fase experimental, durante as viagens do canil até a Escola de Veterinária, durante os dias de inseminação e de ultra-sonografias. Obrigada por tornarem a execução deste trabalho tão prazerosa e gratificante. Obrigada, Zeta, Diana, Alice, Amarula, Íris, Hanna, Olga, Gracie, Sofie, Vida, Yanque, Ranger, Ambros, Strike, Bob, Bárbara, Cindy, Aurora e Gaia, e claro os 45 filhotes!

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para esta conquista,

os meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Inseminação artificial na espécie canina	16
3.1.1 Inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia	17
3.1.2 Determinação do período de inseminação artificial	19
3.2 Fisiologia reprodutiva da cadela	21
3.2.1 Fases do ciclo estral	22
3.2.2 Ovulação na fêmea canina	26
3.3 Coleta de sêmen e avaliação espermática	29
3.4 Diagnóstico de gestação	30
3.5 Previsão da data do parto	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Animais	33
4.2 Determinação do período de inseminação artificial	33
4.3 Coleta de sêmen e avaliação espermática	34
4.4 Inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia	35
• Técnica de inseminação artificial	35
• Dificuldade de cateterização do óstio cervical	36
• Resistência à deposição do sêmen	36
• Refluxo de sêmen	36
• Tempo de duração do procedimento	36
• Índice de crenulação da mucosa vaginal	37
4.5 Equipamento	37
4.6 Diagnóstico de gestação	37
4.7 Análise estatística	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Determinação do período de inseminação artificial	39
5.2. Particularidades da técnica de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia	48
• Cateter para deposição seminal intra-uterina	48
• Dificuldade de cateterização do óstio cervical	49
• Resistência à deposição do sêmen	51
• Refluxo de sêmen	51
• Tempo de duração do procedimento	53
• Tempo de elevação do posterior da cadela após a IA	54
5.3 Coleta de sêmen e avaliação espermática	54
5.4 Diagnóstico de gestação	55
5.5 Duração da gestação	56
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8. ANEXOS	65

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Resultados (média \pm desvio padrão) das inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais assistidas por endoscopia com sêmen fresco em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.	39
Tabela 2	Dia estimado de ocorrência do pico de LH (média \pm desvio padrão) em relação ao primeiro dia do proestro das dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas a inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais assistidas por endoscopia com sêmen fresco.	40
Tabela 3	Valores da progesterona sérica nos dias de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.	40
Tabela 4	Resultados da citologia vaginal (média \pm desvio padrão) nos dias de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.	47
Tabela 5	Valores médios da citologia vaginal nos dias de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.	47
Tabela 6	Valores médios do índice de crenulação da mucosa vaginal e da progesterona nos dias de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador (mediana \pm desvio padrão).	48
Tabela 7	Ocorrência de resistência à deposição do sêmen na primeira, segunda e terceira inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais assistidas por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.	51
Tabela 8	Ocorrência de refluxo de sêmen na primeira, segunda e terceira inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais assistidas por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.	52
Tabela 9	Ocorrência de refluxo de sêmen durante as inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais assistidas por endoscopia com volumes variados de sêmen em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.	52
Tabela 10	Volume de sêmen e frequência de refluxo observados na inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.	52
Tabela 11	Valores médios (média \pm desvio padrão) das motilidades total e progressiva, vigor espermático, volume e dose do sêmen utilizado na inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia.	55

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Anatomia da porção cranial da vagina cadela com os pontos de referência para realização da cateterização do óstio cervical.	18
Figura 2	Anatomia do trato reprodutivo posterior da cadela.	19
Figura 3	Variações hormonais na cadela durante o proestro, estro e período ovulatório.	20
Figura 4	Posicionamento da cadela da raça Retriever do Labrador em estação com contenção manual por um auxiliar, sobre a mesa de superfície anti-derrapante inclinada a aproximadamente 30°, durante a inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida endoscópica.	35
Figura 5	Equipamento e cateter utilizados para a realização da inseminação artificial intra-uterina transcervical endoscópica em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.	38
Figura 6	Cronologia das inseminações artificiais em nove das dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas à IA intra-uterina transcervical assistida por endoscopia, considerando o período de observação da citologia vaginal com pelo menos 80% de células superficiais e o comportamento de aceitação da monta.	41
Figura 7	Cronologia das inseminações artificiais da cadela 7 da raça Retriever do Labrador submetida à IA intra-uterina transcervical assistida por endoscopia, considerando o período de observação da citologia vaginal com pelo menos 80% de células superficiais, a dosagem de progesterona e o comportamento de aceitação da monta.	42
Figura 8	Cronologia das inseminações artificiais da cadela 4 da raça Retriever do Labrador submetida à IA intra-uterina transcervical assistida por endoscopia, considerando o período de observação da citologia vaginal com pelo menos 80% de células superficiais, a dosagem de progesterona e o comportamento de aceitação da monta.	42
Figura 9	Valores da concentração de progesterona sérica durante o acompanhamento do cio e nos dias das inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais endoscópicas (setas) das cadelas da raça Retriever do Labrador utilizadas no presente estudo.	44
Figura 10	Distribuição da progesterona no dia da primeira inseminação das dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas a inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia com sêmen fresco.	45
Figura 11	Distribuição da progesterona no dia da segunda inseminação das dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas a inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia com sêmen fresco.	45
Figura 12	Distribuição da progesterona no dia da terceira inseminação das dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas a inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia com sêmen fresco.	46
Figura 13	Distribuição da progesterona das três inseminações das dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas a inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia com sêmen fresco.	46
Figura 14	Distribuição da frequência de observação dos diferentes graus de dificuldade de cateterização do óstio cervical para a realização de inseminação intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.	50
Figura 15	Distribuição da frequência de observação da resistência à introdução do sêmen durante a realização de inseminação intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.	51
Figura 16	Tempo médio, em minutos, para introdução do cateter no óstio cervical e tempo médio de duração da inseminação intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.	54

Resumo

O presente trabalho teve como objetivos descrever a técnica de inseminação artificial intra-uterina (IA) transcervical endoscópica na espécie canina, investigar sua viabilidade e dificuldades, avaliar a taxa de prenhez e tamanho da ninhada e avaliar os parâmetros comportamentais e reprodutivos, citologia vaginal e progesterona sérica para determinação do período da IA. Dez cadelas da raça Retriever do Labrador foram submetidas a três IA's intra-uterinas transcervicais endoscópicas (com intervalo de 48 horas) durante o estro, utilizando-se sêmen canino fresco. O estro e o período ovulatório foram estabelecidos por avaliações comportamentais, dosagens de progesterona e citologia vaginal possibilitando as IA's no período ótimo do estro. Durante a execução da técnica, foram avaliados: dificuldade de cateterização do óstio cervical, resistência à deposição do sêmen, ocorrência de refluxo seminal e tempo de execução da técnica. Concluiu-se que a técnica de IA intra-uterina transcervical endoscópica mostrou-se viável em cadelas da raça Retriever do Labrador. O cisto-uretróscópio rígido e a camisa endoscópica utilizados foram adequados para a realização da IA. Os métodos utilizados para avaliar os parâmetros comportamentais e reprodutivos foram eficazes para determinar o período de IA. As dosagens de progesterona permitiram determinar a ocorrência do pico de LH e, conseqüentemente, a ovulação. A taxa de prenhez foi de 90%. O tamanho médio da ninhada foi de $5,0 \pm 2,6$ filhotes. Esses resultados foram satisfatórios em comparação com os estudos que utilizaram a inseminação artificial intra-uterina transcervical.

Palavras-chave: inseminação artificial, útero, endoscopia, sêmen fresco, cadela.

Abstract

The aims of the present study were to describe endoscopic transcervical intrauterine artificial insemination (AI) technique in bitches, investigate its viability and difficulties; evaluate pregnancy rate and litter size; and evaluate behavioral and reproductive parameters, as vaginal cytology and serum progesterone assays, to determine time of insemination. Ten Labrador Retriever bitches were submitted to three endoscopic transcervical intrauterine AIs (with 48h intervals), using fresh canine semen. Oestrus and ovulation period were established by behavior evaluations, progesterone assays and vaginal cytology, enabling AI's in optimal timing during oestrus. During AI technique execution, the following aspects were evaluated: cervical os catheterization difficulty, semen deposition resistance, occurrence of semen backflow, and time required to perform the AI. It was concluded that endoscopic transcervical intrauterine AI technique was viable in Labrador Retriever bitches. The rigid cystourethroscope and sheath used fit to perform this technique. The methods employed to evaluate behavioral and reproductive parameters during the estrous cycle were effective to determine time of AI. Serial serum progesterone assays enabled determination of LH surge day, and thus ovulation. Pregnancy rate was 90 % (9 in 10 bitches). Mean litter size was $5,0 \pm 2,6$ puppies. These results were satisfactory in comparison with previous studies using transcervical intrauterine AI.

Key words: artificial insemination, uterus, endoscopy, fresh semen, bitch.

1. INTRODUÇÃO

A cinofilia tem se tornado uma atividade crescente, e tem sido acompanhada pela mudança na relação homem-animal, com o aumento da proximidade dos cães com o homem como animais de companhia. Dessa forma, tem sido atribuído ao animal um papel significativo na promoção do bem-estar físico e mental das pessoas, contribuindo para a melhora da sua qualidade de vida (Faraco e Seminotti, 2004). Além disso, a criação de cães de raça tem se tornado uma atividade comum e economicamente rentável no Brasil, com a produção de animais de alto valor zootécnico.

A importância do estudo e aprimoramento técnico-científico das biotécnicas da reprodução relacionadas à inseminação artificial (IA) tem se tornado crescente visando a maximização do uso e a seleção do material genético de reprodutores, além de otimizar o aproveitamento dos estros férteis das fêmeas.

A IA consiste na deposição do sêmen no trato genital da fêmea, tendo sido inicialmente praticada em cadelas no final do século XVIII. As indicações para realização dessa técnica são: a impossibilidade na realização da monta natural, devido a problemas anatômicos, comportamentais, patológicos e sanitários, ou ainda para utilização de sêmen resfriado ou congelado (Silva et al., 1996; Santos e Vannucchi, 1997; Johnston et al., 2001; Silva et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004).

Na cadela, a IA pode ser realizada pela via intravaginal ou intra-uterina, com deposição de sêmen fresco, refrigerado ou congelado. A inseminação intravaginal é a mais comumente realizada, por ser de fácil execução quando comparada com a inseminação intra-uterina. Por outro lado, alguns estudos obtiveram maiores taxas de

prenhez com a deposição intra-uterina do sêmen ao invés da deposição intravaginal profunda. No entanto, o acesso ao útero canino, pela via vaginal, é difícil, pois a cérvix apresenta uma anatomia desfavorável para a passagem de uma sonda sem visualização. Dessa forma, é pertinente pesquisar técnicas minimamente invasivas (laparoscopia) e não invasivas (transcervical assistida por endoscopia) para viabilizar a inseminação artificial intra-uterina na cadela (Wilson, 1993; Silva et al., 1995; Silva et al., 1996; Linde-Forsberg et al., 1999; Linde-Forsberg, 2001).

A importância desta pesquisa está demonstrada quando se considera o estudo de uma técnica inovadora, não invasiva, capaz de propiciar maiores taxas de fertilidade com a deposição do sêmen no interior do útero. Adicionalmente, a deposição do sêmen no ambiente intra-uterino permitirá a utilização de menores doses inseminantes, sem prejuízo na taxa de gestação, permitindo otimizar a utilização do sêmen canino.

2. OBJETIVOS:

- Descrever a técnica de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia na espécie canina, bem como investigar sua viabilidade e dificuldades inerentes à técnica;
- Avaliar a taxa de prenhez e tamanho da ninhada obtidos com a essa técnica utilizando sêmen canino fresco em três inseminações por estro em cadelas da raça Retriever do Labrador;
- Avaliar os parâmetros comportamentais e reprodutivos, citologia vaginal e dosagens de progesterona sérica das cadelas da raça Retriever do Labrador para determinação do período de

realização da inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Inseminação artificial na espécie canina

Existem atualmente diferentes técnicas de IA disponíveis, dependendo do local de deposição do sêmen, podendo ser intravaginal ou intra-uterina. A inseminação pela via vaginal pode ser feita com pipeta bovina ou com sonda de Osíris (Fontbonne e Badinand, 1993; Silva et al., 1996). Já a deposição intra-uterina do sêmen pode ser realizada através de cateterização do canal cervical (inseminação intra-uterina transcervical) com cateter rígido metálico (Andersen, 1975; Fontbonne e Badinand, 1993; Wilson, 1993), com cateter norueguês (Linde-Forsberg et al., 1999; Linde-Forsberg, 2001; Blendinger, 2007b) ou sob visualização endoscópica da cérvix para introdução de cateter urinário (Wilson, 1993; Linde-Forsberg et al., 1999; Linde-Forsberg, 2001; Wilson, 2003). A deposição do sêmen no interior do útero pode ainda ser conseguida cirurgicamente via laparotomia (Linde-Forsberg, 2001; Silva et al., 2003) ou pela abordagem laparoscópica (Silva et al., 1995; Silva et al., 1996; Malm et al., 2000).

A inseminação intravaginal é de fácil execução, mas não apresenta bons resultados com sêmen congelado, sendo indicada para sêmen fresco e de boa qualidade (Fontbonne e Badinand, 1993). No entanto, a vagina constitui um ambiente desfavorável para o espermatozóide canino, uma vez que a maioria dos mesmos perde a cauda minutos após a deposição do sêmen na vagina cranial. Além disso, é necessário um número dez vezes maior de espermatozoides na inseminação intravaginal para se obter os mesmos resultados da inseminação intra-

uterina com sêmen fresco ou congelado (Linde-Forsberg, 2001).

Com relação às técnicas de inseminação intra-uterina, a cateterização transcervical via endoscópica vem sendo estudada, com resultados satisfatórios (Wilson, 2003; Pretzer et al., 2006), mas exige prática do operador e apresenta maiores dificuldades dependendo do comprimento e largura da vagina, as quais podem ser minimizadas pela utilização de equipamento adequado. Essa técnica pode ser utilizada em cadelas de portes variados, obesas ou tensas, nas quais a manipulação abdominal da cérvix para a introdução do cateter é difícil ou impossível, dificultando a realização da cateterização transcervical com cateter rígido (Wilson, 2003). Vale ressaltar que a inseminação com endoscopia requer a aquisição de um equipamento caro (Tsumagari et al., 2003).

As técnicas cirúrgicas de inseminação intra-uterina exigem plano anestésico cirúrgico e podem interferir na motilidade uterina e na migração dos oócitos (Tsutsui, 1989; Silva et al., 1995). Embora a laparoscopia apresente caráter minimamente invasivo, tempo de recuperação anestésica reduzido e mínimo risco de infecção pós-operatória (Silva et al., 1995; Fukushima, 2008), a realização de inseminações por métodos cirúrgicos tem sido considerada anti-ética, quando existe a alternativa do procedimento não-cirúrgico (Farstad, 2000; Fontbonne, 2006; Chatdarong et al., 2007). No entanto, Concannon (2004) relatou que a inseminação intra-uterina via laparoscopia sob anestesia geral pode ser a melhor opção caso a fêmea apresente temperamento difícil, e não permita a manipulação para a realização da vaginoscopia e inseminação transcervical.

A inseminação intra-uterina fica reservada para os casos nos quais a via vaginal poderia comprometer os resultados da IA, como, por exemplo, quando se deseja melhorar as taxas de fertilidade de machos oligospermicos

(Johnston et al., 2001) ou na utilização de sêmen congelado com baixa qualidade pós-descongelamento (Silva et al., 2003; Concannon, 2004).

Na espécie canina, o sucesso da IA depende de fatores tais como sêmen de boa qualidade, momento correto da inseminação, local anatômico apropriado para a deposição do sêmen, dependendo se esse é fresco, resfriado ou congelado (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004), e ainda da frequência de inseminações por estro (Wilson, 1993; Linde-Forsberg, 2001).

Para que sejam obtidas boas taxas de prenhez, é necessário que o sêmen congelado seja depositado no interior do útero, sendo que o sêmen fresco ou resfriado pode ser depositado na região posterior da vagina sem que haja prejuízo nos resultados (Wilson, 1993; Linde-Forsberg et al., 1999; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Silva et al., 2003). No entanto, alguns estudos vêm indicando maiores taxas de prenhez com a deposição intra-uterina do sêmen fresco ou congelado ao invés da deposição intravaginal profunda (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989; Linde-Forsberg, 2001).

Tem sido demonstrado que as taxas de prenhez e o tamanho das ninhadas aumentam com o número de inseminações por estro (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989; Wilson, 1993; Linde-Forsberg, 2001; Thomassen et al., 2006). Alguns autores (Farstad e Andersen-Berg, 1989; Wilson, 1993; Silva, 1995, citado por Silva et al., 2003) recomendam a realização de duas inseminações com intervalos de 48 horas, quando da utilização de sêmen fresco ou congelado. Outros autores recomendam IA's a cada 24 horas com sêmen congelado (Shimatsu et al., 2000; Feldman e Nelson, 2004; Thomassen et al., 2006). Normalmente, recomenda-se que a dose inseminante seja de pelo menos 150 a 200x10⁶ espermatozoides (Jeffcoate e

Lindsay, 1989; Johnston et al., 2001), no entanto, taxas de fertilidade satisfatórias já foram obtidas com doses inseminantes de 35x10⁶ espermatozoides móveis após IA intra-uterina com sêmen congelado (Wilson, 1993).

Na literatura consultada, foram encontrados estudos que utilizaram uma, duas ou mais inseminações intra-uterinas transcervicais com sêmen fresco (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989) e congelado (Farstad e Andersen-Berg, 1989; Ferguson et al., 1989; Fontbone e Badinand, 1993; Linde-Forsberg et al., 1999) por estro com intervalos de um ou dois dias, resultando em taxas de prenhez variadas. No entanto, nesses estudos, a frequência de inseminações por estro foi determinada com base nos achados clínicos e hormonais em cada cadela a ser inseminada de acordo com a evolução do cio, sem que houvesse um protocolo de inseminações pré-estabelecido. Linde-Forsberg (2001) destacou a escassez de trabalhos publicados sobre inseminação artificial em cães, por ser dispendioso realizar estudos experimentais em cães e, por isso, poucos centros de pesquisa são capazes de manter o número necessário de cães para esse tipo de estudo.

3.1.1 Inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia

A técnica de inseminação transcervical assistida por endoscopia foi desenvolvida na Nova Zelândia por Marion Wilson, tendo como uma grande vantagem permitir a visualização direta do óstio cervical (Wilson, 1993). Mas ainda envolve a manipulação do endoscópio e do cateter simultaneamente e requer prática e destreza do operador. Pode ser necessária a aquisição de endoscópios de diâmetro e comprimento variados para possibilitar a cateterização de cadelas de todos os tamanhos com essa técnica (Silva et al., 2003; Wilson, 2003; Fontbonne, 2006).

Para a realização dessa técnica, deve-se considerar algumas particularidades da anatomia da espécie canina que dificultam a cateterização da cérvix. O acesso ao óstio cervical é restrito pela prega mediana dorsal, pelo lúmen estreito da porção vaginal da paracérvix e o direcionamento ventral do óstio cervical externo (Fig.1) (Wilson, 1993; Johnston et al., 2001). A posição do clitóris no interior da comissura ventral da vulva e do óstio uretral ventralmente no vestíbulo devem ser evitados; e a presença das pregas vaginais pode dificultar a passagem do endoscópio. Além disso, a porção cranial da vagina, ou paracérvix, apresenta características importantes em relação à cateterização do óstio cervical (Wilson, 2003). Dessa forma, a localização e a mobilidade da cérvix e a inclinação dorsal do canal cervical tornam sua cateterização difícil na cadela (Brearley et al., 1991; Johnston et al., 2001; Cremonesi et al., 2005).

A prega mediana dorsal é uma prega mais firme localizada longitudinalmente na parede dorsal da vagina, reduzindo significativamente o lúmen vaginal até que se possa visualizar a cérvix (Fig.1). Um

ponto de referência importante é o tubérculo cervical, que consiste na porção vaginal da cérvix, incluindo o óstio e o canal cervical (Fig.1). O tubérculo cervical está localizado na extremidade cranial da prega mediana dorsal e está separada da mesma por uma prega transversal evidente. A cérvix encontra-se diagonalmente na junção uterovaginal com o óstio cervical posicionado ventralmente na direção do assoalho vaginal e o canal cervical direcionado craniodorsalmente da vagina para o útero (Fig.1) (Lindsay e Concannon, 1986; Stone et al., 1998; Johnston et al., 2001; Wilson, 2003). O canal cervical apresenta cinco a dez milímetros de comprimento, e nem sempre é reto, podendo ser sinuoso (Linde-Forsberg, 2001; Blendinger, 2007b). A cateterização do canal cervical pode ser realizada em qualquer fase do ciclo estral, no entanto a facilidade de introdução do cateter varia de acordo com o estágio do ciclo e com a experiência do operador. O fórnix consiste no espaço crânio-ventral ao tubérculo cervical e representa o limite cranial da vagina (Fig.1) (Johnston et al., 2001; Wilson, 2003).

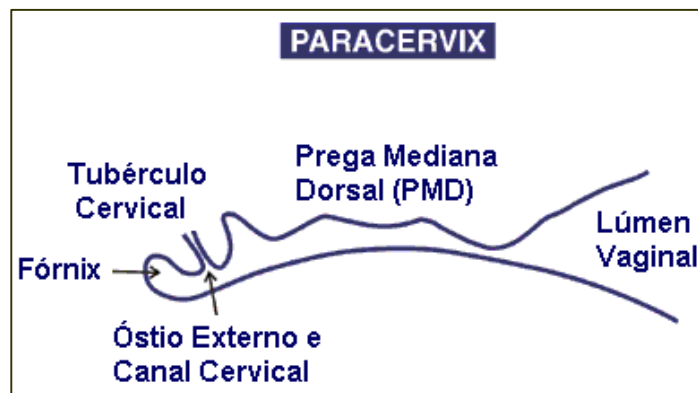


Figura 1: Anatomia da porção cranial da vagina da cadela com os pontos de referência para realização da cateterização do óstio cervical. Fonte: Feldman e Nelson (2004).

O equipamento endoscópico utilizado na inseminação transcervical assistida por endoscopia deve apresentar características

específicas em função do espaço significativamente reduzido ao longo da prega mediana dorsal e da vagina

relativamente longa na fêmea canina, podendo atingir até 29 cm de comprimento. O equipamento deve incluir um endoscópio rígido de 30°, uma camisa endoscópica com entrada para instrumentos, uma fonte de luz fria e cabo de fibra óptica, além de câmera e monitor. O cateter que é introduzido no canal cervical e que permite a deposição intra-uterina do sêmen pode ser do tipo urinário, preferencialmente com orifício terminal ao invés de orifícios laterais (Wilson, 2003; Fontbonne, 2006).

A introdução do endoscópio deve ser realizada através da vulva na direção dorso-cranial passando pelo vestibulo até o arco isquiático e então mudar o ângulo de introdução do endoscópio de forma que ele fique na posição horizontal permitindo o avanço ao longo do lúmen vaginal (Fig. 2). Essa inserção dorso-cranial obedece a angulação anatômica do trato genital posterior da cadela, minimizando a ocorrência de trauma, e evita a introdução do endoscópio na fossa clitoriana ou no meato urinário (Brearley et al., 1991).

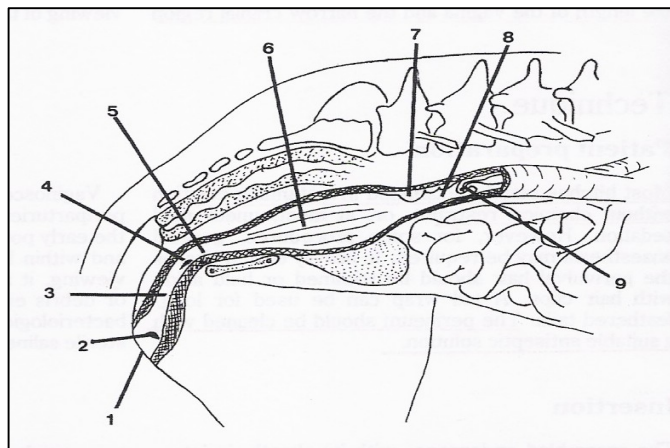


Figura 2: Anatomia do trato reprodutivo posterior da cadela. (1) Vulva; (2) Fossa clitoriana; (3) Vestibulo; (4) Óstio uretral externo; (5) Junção vestibulo-vaginal; (6) Porção caudal da vagina; (7) Tubérculo caudal da prega mediana dorsal; (8) Paracérvix; (9) Cérvix. Fonte: Brearley et al. (1991).

A área paracervical pode ser traumatizada caso o endoscópio seja introduzido com força excessiva. Se a introdução do endoscópio causar desconforto para a cadela, o procedimento deve ser interrompido. No entanto, essa técnica é bem tolerada na fase de estro, sem que haja necessidade de sedação ou anestesia (Wilson, 2003).

3.1.2 Determinação do período de inseminação artificial

Estabelecer o período correto para a inseminação artificial é um ponto importante na reprodução da espécie canina, já que a

duração do ciclo estral é longa e variável, bem como as fases de proestro, estro e o período de ovulação (Fig. 3). O período de fertilização e o período fértil devem ser identificados para que a IA tenha sucesso e resulte em prenhez (Jeffcoate e Lindsay, 1989; England e Concannon, 2002). O período de fertilização consiste naquele em que oócitos viáveis estão disponíveis nas tubas uterinas e encontram-se suficientemente maduros como oócitos secundários para serem fertilizados. Na maioria das cadelas, esse período estende-se desde o terceiro ou quarto até o sexto ou sétimo dia após a ocorrência do pico do hormônio luteinizante (LH). Já o período

fértil é aquele em que a monta natural ou a inseminação pode resultar em prenhez. Esse período inclui não apenas o período de fertilização, mas também os três dias que o precedem, uma vez que o espermatozóide

canino pode permanecer fértil por pelo menos cinco a seis dias no interior do trato reprodutivo da cadela (Jeffcoate e Lindsay, 1989; England e Concannon, 2002).

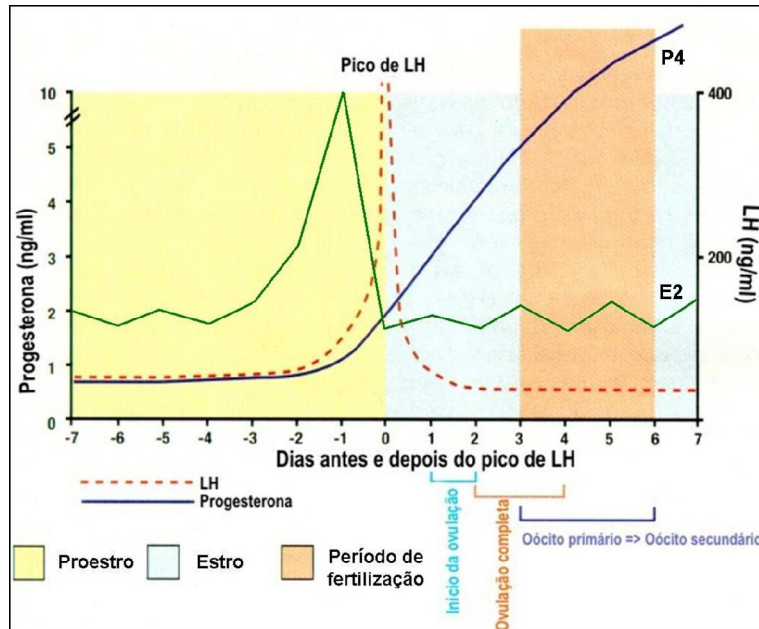


Figura 3: Variações hormonais na cadela durante o proestro, estro e período ovulatório. P4: progesterona; E2: estrógeno. Adaptado de <http://www.hilltopanimalhospital.com/>.

O acompanhamento adequado do proestro e estro da cadela baseia-se em alguns critérios essenciais: observação das mudanças no trato genital e comportamentais (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Silva et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004), na monitoração com citologia vaginal (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Silva et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004), na vaginoscopia para observação das alterações da mucosa vaginal (índice de crenulação) (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Brearley et al., 1991; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Silva et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004) e nas dosagens plasmáticas ou séricas de progesterona (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Farstad e

Andersen-Berg, 1989; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Silva et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004).

A detecção acurada do período ovulatório é considerada pela maioria dos autores como um dos fatores mais importantes para determinar quando a cadela deve ser inseminada (Lévy e Fontbonne, 2007).

A fase ovulatória na fêmea canina inicia aproximadamente dois dias após o pico do hormônio luteinizante (LH), quando os níveis séricos de progesterona estão entre 2 e 4 ng/ml, e pode durar de 24 a 96 horas, com liberação de 75% dos folículos em até 72 horas. Os óvulos liberados são oócitos primários e requerem 24 a 72 horas de maturação antes que possam ser fertilizados.

Uma vez maduros, a vida fértil de cada oócito pode durar de dois a quatro dias, indicando que a fase fértil nessa espécie é relativamente longa (Concannon et al., 1989; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Feldman e Nelson, 2004; Fontbonne e Malandain, 2006).

A inseminação artificial com sêmen fresco deve ser realizada no início do período ovulatório da cadela, uma vez que os espermatozoides recém ejaculados podem sobreviver pelo menos quatro a seis dias nos reservatórios espermáticos localizados na junção útero-tubárica e nas glândulas uterinas da cadela (Rijsselaere et al., 2004; Luz et al., 2005), abrangendo dessa forma a fase fértil dos oócitos em processo de maturação e dos já maturados (Concannon et al., 1989; Linde-Forsberg e Forsberg, 1989; England e Concannon, 2002). Além disso, o transporte e a distribuição dos espermatozoides no trato genital da cadela também são influenciados pelo evento da ovulação, provavelmente devido à atividade quimiotática e quimiocinética do fluido folicular liberado após a ovulação sobre os espermatozoides (Rijsselaere et al., 2004).

Segundo England e Concannon (2002), o período de maior fertilidade da cadela encontra-se entre dois dias antes da ovulação, ou seja, desde o dia do pico de LH até quatro dias após a ovulação. No caso da realização de mais de uma inseminação, a primeira deve ser no dia provável de ovulação, com base nas dosagens de progesterona, para “compensar” a possibilidade de erro ou atraso na estimativa do pico de LH e da ovulação (England e Concannon, 2002). Com sêmen fresco, recomenda-se que a inseminação artificial seja realizada em dias alternados entre os dias três e seis após o pico de LH (Meyers-Wallen, 2007).

3.2 Fisiologia reprodutiva da cadela

É importante compreender os eventos do ciclo estral da cadela para conduzir adequadamente e aperfeiçoar as biotécnicas da reprodução assistida, entre elas a inseminação artificial. Quando comparada com outras espécies, a cadela possui características da fisiologia reprodutiva incomuns, tais como longa duração do proestro e estro, ovulação de oócitos em estágio imaturo, longo período pré-implantação e tempo prolongado de transporte na tuba uterina (nove a 12 dias) (Concannon et al., 1989; Reynaud et al., 2006).

O ciclo ovariano na cadela é monoestral não-estacional, havendo considerável variação na extensão e sincronização das alterações hormonais (Concannon et al., 1989; Johnston et al., 2001). O intervalo entre ciclos varia em uma mesma cadela, entre cadelas da mesma raça e de uma raça para outra, oscilando entre quatro e 13 meses, e na média, é de sete meses (Stone et al., 1998; Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004). À medida que as cadelas avançam da idade ótima para reprodução, várias mudanças são prováveis de ocorrer, incluindo aumento progressivo da duração do intervalo interestros, redução do tamanho da ninhada, aumento de defeitos congênitos nos filhotes, no número de natimortos e distocias (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004).

Na maioria das cadelas, a puberdade tem início por volta dos seis a nove meses de idade. Raças de pequeno porte normalmente entram na puberdade entre seis e dez meses de idade, enquanto que as de grande porte podem apresentar uma variação que vai desde antes do primeiro ano de idade até 18 a 24 meses. A idade ideal para reprodução nas cadelas é entre dois e seis anos de idade, sendo que a primeira gestação é recomendada apenas durante o segundo ou

terceiro cio (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004).

3.2.1 Fases do ciclo estral

O ciclo reprodutivo da cadela está dividido em quatro fases distintas: proestro, estro, diestro e anestro, estabelecidas por alterações hormonais que induzem a transformações de ordem morfológica e clínica, citológicas, vaginais e cervicais (Rodrigues e Rodrigues, 2002; Butinar et al., 2004; Feldman e Nelson, 2004).

Proestro:

A fase de proestro dura normalmente seis a 11 dias, em média nove dias, podendo variar desde dois ou três até 25 dias, e é caracterizada pela observação de edema e turgidez dos lábios vulvares e corrimento vulvar sanguinolento. Nesta fase, a fêmea apresenta mudanças no comportamento tais como aumento das brincadeiras e provocação do macho, porém não permite a monta, sentando-se ou demonstrando agressividade ao macho. A fêmea também mantém a cauda abaixada sobre o períneo, entre os membros pélvicos, cobrindo a vulva. As mudanças comportamentais do proestro são resultantes das concentrações elevadas de estrógeno (Concannon et al., 1989; Johnston et al., 2001). O sangramento vaginal inicia com a diapedese dos eritrócitos através do endométrio e com a ruptura de vasos subepiteliais endometriais, em conjunto com a secreção das glândulas uterinas. O sangue passa pela cérvix discretamente relaxada e chega ao vestíbulo vaginal. A cadela em proestro encontra-se sob influência estrogênica, estrógeno este que é produzido pelos folículos ovarianos em desenvolvimento (Johnston et al., 2001; Rodrigues e Rodrigues, 2002; Feldman e Nelson, 2004).

Os folículos que desenvolvem sob influência da estimulação das gonadotropinas amadurecem e adquirem a capacidade de

síntese e secreção de estrógeno. Esse hormônio resulta nas alterações comportamentais, descarga vaginal, atração de machos e preparação uterina para a prenhez (Oliveira et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004).

As concentrações de estrógeno circulantes durante o anestro são de 5 a 15 pg/ml. No início do proestro, essas concentrações aumentam para 25 pg/ml e, no final dessa fase, podem exceder 60 a 70 pg/ml, sendo que o pico ocorre 24 a 48 horas antes do término do proestro (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004).

As concentrações de progesterona são basais (<0,5ng/ml) por todo o proestro com exceção das últimas 24 a 72 horas. O final do proestro e início do estro podem ser identificados pelas concentrações plasmáticas de progesterona, que aumentam além de 1,0 ng/ml (Fig. 3) (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004). A progesterona é secretada pelos folículos progressivamente mais luteinizados antes da ocorrência da ovulação e formação dos corpos lúteos. Progressivamente, mais progesterona e menos estrógeno são sintetizados enquanto a fêmea avança pelo estro (Concannon et al., 1989; Butinar et al., 2004; Feldman e Nelson, 2004).

O esfregaço vaginal de uma cadela no início do proestro revela a presença de células parabasais em grande número e células intermediárias pequenas e grandes, além de eritrócitos provenientes do endométrio. Os polimorfonucleares são comuns, e pode haver a presença de bactérias em quantidades variadas. No decorrer do proestro, o epitélio vaginal, sob ação estrogênica, aumenta suas camadas (estratificação epitelial) e há também o aumento das células de descamação. As células mais distantes do estrato basal, sofrendo com a redução do aporte nutricional e de oxigênio, acabam degenerando. Isso provoca a diminuição das

células parabasais e intermediárias e o aumento das células epiteliais superficiais, associados ao desaparecimento dos polimorfonucleares devido ao espessamento da parede que impede a sua passagem até o lúmen vaginal (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Rodrigues e Rodrigues, 2002; Goodman, 2002; Feldman e Nelson, 2004).

No final do proestro, mais de 80% das células observadas no esfregaço vaginal são epiteliais superficiais, com núcleo picnótico, ou até mesmo anucleadas (Jeffcoate e Lindsay, 1989; England e Concannon, 2002; Goodman, 2002; Feldman e Nelson, 2004). A amostra de citologia vaginal deve ser obtida da porção cranial dorsal da vagina, uma vez que as células do vestíbulo ou da fossa clitoriana não são tão indicativas do estágio do ciclo (Blendinger, 2007a).

Estro:

A fase de estro inclui o período em que a fêmea permite a monta e a cobertura por parte do macho, sendo caracterizada por mudanças comportamentais como agaixar-se e elevar o períneo em direção ao macho, elevar a cauda e adotar posição de lordose diante de qualquer pressão sobre ou próxima à região posterior (dorso). Nesta fase, a vulva deixa de ser túrgida e firme (como durante o proestro), passando a apresentar-se flácida e macia, não mais representando uma barreira para a penetração do pênis. A duração do estro normalmente é de cinco a nove dias, podendo variar entre cadelas normais de um a 20 dias (Concannon et al., 1989; Feldman e Nelson, 2004).

A cadela começa a exibir sinais de estro quando as concentrações séricas de estrógeno anteriormente elevadas passam a declinar (Fig. 3), em consequência do fim do processo de maturação dos folículos, vários dias antes da ovulação, quando esses passam a secretar menos estrógeno e mais progesterona, provocando a

retroalimentação positiva ao hipotálamo e à hipófise, resultando na liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e, mais importante, do LH, no começo do estro (Concannon et al., 1989; Oliveira et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004).

A progesterona sérica aumenta acima das concentrações basais antes da onda de LH, pois as células foliculares luteinizadas secretam progesterona antes do desenvolvimento dos corpos lúteos. Aproximadamente 24 a 48 horas antes da onda de LH pré-ovulatória, a concentração de progesterona sérica passa de 0,5 ng/ml (típica de anestro e proestro) para 1,0 ng/ml, atingindo concentrações de 2 a 4 ng/ml no momento do pico de LH, que estimula a ovulação dentro de 24 a 48 horas. Ocorre então a formação dos corpos lúteos, e os níveis de progesterona aumentam para 4 a 10 ng/ml, durante a fase ovulatória. Com o desenvolvimento dos corpos lúteos funcionais, as concentrações desse hormônio continuam a aumentar por um período de uma a três semanas (Johnston et al., 2001; Goodman, 2002; Feldman e Nelson, 2004).

As alterações hormonais descritas promovem as mudanças anatômicas que ocorrem simultaneamente no ovário. O início do estro está associado com o final do processo de maturação dos folículos em desenvolvimento. O número de óvulos liberados para futura fertilização depende da raça. Fêmeas de menor porte ovulam cerca de dois a dez óvulos, enquanto as fêmeas de maior porte podem ovular cinco a 15 óvulos (Feldman e Nelson, 2004; Marinelli et al., 2008).

A citologia vaginal permanece relativamente constante durante o estro, estando associada às concentrações de estrógeno que, mesmo em declínio em direção aos níveis basais, encontram-se elevadas. O esfregaço vaginal neste período revela mais de 80% das células do tipo superficial e células anucleadas, muitas vezes atingindo 100%.

Não observam-se polimorfonucleares, e tanto eritrócitos quanto bactérias podem ou não estar presentes (Linde e Karlsson, 1984; Wright, 1990; Johnston et al., 2001; Goodman, 2002; Feldman e Nelson, 2004).

Diestro:

O diestro é a fase de dominância progesterônica e começa com o final do estro e termina quando as concentrações de progesterona retornam aos níveis basais (<1,0 ng/ml). Esta fase tem duração média de 56 a 58 dias na gestação e 60 a 100 dias na cadela não-gestante. Com o início do diestro, a cadela apresenta comportamento de rejeição à monta (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004).

O pico da produção de progesterona por parte dos corpos lúteos normalmente é atingido 20 a 30 dias após a ovulação, permanecendo praticamente constante em um plateau de 15 a 60 ng/ml por mais uma a duas semanas, período após o qual a função dos corpos lúteos começa a declinar (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004). Concentrações elevadas de progesterona são importantes para a manutenção da gestação, pois ela é responsável pelo desenvolvimento das glândulas endometriais, secreção de fluidos uterinos, crescimento endometrial, manutenção da placenta, inibição da motilidade uterina e eliminação da resposta leucocitária no interior do útero (Oliveira et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004). Na cadela, o corpo lúteo é a única fonte de progesterona circulante durante a prenhez. Na primeira metade da gestação, os corpos lúteos parecem ser independentes do LH para a produção de progesterona, enquanto que, na segunda metade, são necessárias altas concentrações de prolactina e concentrações basais de LH para a manutenção funcional dos corpos lúteos, por serem hormônios luteotróficos (Concannon et al., 1989; Johnston et al., 2001; Feldman e

Nelson, 2004; Concannon, 2005; Luz et al., 2005; Marinelli et al., 2008).

Os corpos lúteos estão localizados na superfície dos ovários durante o diestro. O útero responde ao aumento das concentrações de progesterona mantendo a estrutura glandular e a vascularização necessárias para a manutenção da gestação (Feldman e Nelson, 2004). Marinelli et al. (2008) observaram que as características dos corpos lúteos são influenciadas pela idade da cadela, uma vez que cadelas adultas continham maior número de corpos lúteos com maior eficiência na produção de progesterona do que as cadelas com idade inferior a 2,5 anos, sugerindo que a atividade luteínica endócrina passa por um processo de maturação durante a idade adulta.

O início do diestro é marcado pela repentina alteração da citologia vaginal (Rodrigues e Rodrigues, 2002), que pode ocorrer aproximadamente três dias antes do término do comportamento característico do estro e cinco a sete dias após a ovulação (Johnston et al., 2001). Nos primeiros dias do diestro, o esfregaço vaginal assemelha-se ao do início do proestro: células de defesa podem ou não estar presentes, eritrócitos estão ausentes ou em pequeno número e observa-se células intermediárias pequenas e células parabasais, além de ser possível identificar “células do metaestro”, características desta fase (Johnston et al., 2001; Goodman, 2002; Feldman e Nelson, 2004).

A fase luteínica termina abruptamente na fêmea gestante (aproximadamente 65 dias após a fertilização) em decorrência da ação das prostaglandinas durante o parto. No entanto, na fêmea não-gestante, a fase luteínica decresce lentamente, freqüentemente persistindo por mais dez a 30 dias. Todas as cadelas não-gestantes que passaram pelo estro estão em “pseudogestação” já que elas possuem corpos lúteos funcionais apesar da ausência da gestação; portanto os corpos lúteos

funcionam por um período de gestação normal independente da presença ou ausência do(s) feto(s) (Johnston et al., 2001; Oliveira et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004). Portanto, o perfil hormonal sérico é similar nas fêmeas prenhes e não-prenhes, com as concentrações de progesterona não diferindo entre os 15 dias precedentes e o 40 dias subseqüentes ao pico de LH (Rodrigues e Rodrigues, 2002).

Um a dois dias antes do parto, ocorre o rápido declínio da progesterona de 4 a 10 ng/ml para valores inferiores a 2 ng/ml em 12 a 24 horas, resultando no início do parto normal. O declínio da progesterona associado à luteólise ocorre em resposta ao aumento de prostaglandina para níveis luteolíticos, que por sua vez ocorre devido à maturação do eixo hipófise-adrenal do feto e à elevação do corticóide fetal (Johnston et al., 2001; Concannon e Verstegen, 2004).

O tamanho máximo do útero não-gestante é observado 20 a 30 dias após o início do diestro, coincidindo com os níveis máximos de progesterona. Com a degeneração dos corpos lúteos e a interrupção na produção de progesterona, o diestro termina e o útero passa por um período de reparo. Este período de involução uterina requer um a três meses (independente da ocorrência de gestação) e pode representar um dos fatores que contribuem para que o período de interesse seja relativamente longo em cadelas normais (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004). O intervalo entre os estros é maior em cadelas mais velhas (Johnston et al., 2001; Oliveira et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004), e fêmeas com mais de seis anos de idade tendem a ter a fertilidade reduzida, provavelmente em decorrência de alterações uterinas relacionadas à senescência reprodutiva (Thomassen et al., 2006).

A prolactina é um dos hormônios chave do diestro; e suas concentrações estão baixas durante o anestro, proestro e estro. Com o

decréscimo das concentrações de progesterona na segunda metade do diestro, os níveis de prolactina aumentam numa relação inversa, que ocorre tanto em cadelas gestantes quanto nas não-gestantes, sendo considerada um hormônio luteotrófico a partir desse período (Oliveira et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004). No final da gestação, a prolactina é responsável pelo aumento do tamanho e da atividade secretória das glândulas mamárias (Feldman e Nelson, 2004).

Anestro:

O anestro é a fase do ciclo reprodutivo em que o útero involui e também é referida como um período de quiescência do eixo hipotálamo-hipófise-ovários. Como as demais fases do ciclo ovariano, o anestro tem duração variada, a qual depende da raça, estado de saúde, idade, época do ano, ambiente, e vários outros fatores. Nenhuma diferença clínica pode ser observada entre uma cadela em anestro e uma cadela submetida a ovariectomia (Concannon et al., 1989; Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004).

Durante o anestro, ondas esporádicas de LH podem ocorrer, e estes aumentos abruptos do LH plasmático parecem levar a dois grandes e potentes episódios secretórios, apesar de terem curta duração: um pico de LH imediatamente antes do início do proestro e outro no início do estro com subseqüente ovulação. Os aumentos esporádicos de LH durante o anestro são responsáveis pelo recrutamento necessário de folículos para o próximo ciclo. Uma vez recrutados para o *pool* pré-ovulatório, esses folículos seletivamente regulam a secreção de gonadotrofinas pela hipófise via mecanismos de retroalimentação negativa. Durante essa fase, os folículos não se tornam completamente maduros, regredindo após um curto período de função, e antes de desenvolver células luteinizadas que

poderiam produzir progesterona (Feldman e Nelson, 2004).

A concentração de FSH encontra-se aumentada (em torno de 260 ± 30 ng/ml) durante o anestro e, com o início do proestro, a produção desse hormônio é inibida, passando para 140 ng/ml, devido ao feedback negativo provocado pelo estrógeno (Concannon, 1986; Concannon et al., 1989).

A citologia vaginal do anestro é relativamente constante, com pouca celularidade na lâmina, sendo possível observar células parabasais e intermediárias profundas. Os polimorfonucleares podem estar presentes ou não e eritrócitos geralmente estão ausentes, pode-se observar ou não bactérias, e quando presentes normalmente são bactérias da própria flora vaginal (Feldman e Nelson, 2004).

3.2.2 Ovulação na fêmea canina

O pico de LH é o momento mais marcante do ciclo estral da cadela, pois todos os eventos, da ovulação ao parto, lhe são retroativos. A constância temporal registrada no intervalo entre o pico de LH e a ovulação faz com que a expressão máxima desta gonadotrofina na circulação seja referenciada na literatura como o Dia zero do ciclo da fêmea canina (Rodrigues e Rodrigues, 2002; Kutzler et al., 2003a; Concannon, 2005; Blendinger, 2007a).

Na fêmea canina, as ovulações são múltiplas e parecem acontecer de forma sincronizada à ruptura dos folículos, ocorrendo num intervalo de tempo entre 12 e 96 horas após o pico de LH (Concannon et al., 1989; Hase et al., 2000; Butinar et al., 2004; Reynaud et al., 2006). Wildt et al. (1978) observaram que, em 77,2% dos ciclos estrais estudados, folículos de uma mesma cadela e no mesmo ciclo estral, ovularam, em 24 a 72 horas após pico do LH, tendo a ovulação sido detectada através de laparoscopias seriadas com intervalos de 48 horas. No entanto,

6,5% das fêmeas avaliadas apresentaram evidências de ovulação até cinco a 14 dias após o pico de LH.

O pico de LH provoca um rápido aumento de volume e luteinização dos folículos primários, causa a ovulação e, no processo, transforma os folículos de 3-4 mm de diâmetro produtores de estrógeno e progesterona em corpos lúteos de 8-9 mm secretores de progesterona (Concannon et al., 1989). Na cadela, folículos poliovulares não são incomuns e podem dar origem a um ou até quatro oócitos durante a ovulação (Luz et al., 2005; Reynaud et al., 2006).

Segundo Lévy e Fontbonne (2007), na maioria das cadelas examinadas, o processo de ovulação pareceu estar completo em 24 horas após o pico de LH. Os oócitos imaturos são liberados dos folículos de forma espontânea como oócitos primários, e estão no início da primeira divisão meiótica, na forma de vesícula germinativa (prófase I). No interior da bursa ovariana, inicia-se a maturação extra-folicular, e a meiose completa-se durante o transporte pela tuba uterina. São necessárias entre 48 e 72 horas para que os eventos da maturação sejam concluídos na porção distal do oviduto (Concannon et al., 1989; Hase et al., 2000; Fontbonne e Malandain, 2006; Reynaud et al., 2006; Blendinger, 2007a; Lévy e Fontbonne, 2007), os oócitos alcançam o estágio de metáfase II e verifica-se a eliminação do primeiro corpúsculo polar (Tsutsui, 1989; England e Concannon, 2002). In vivo, a fertilização ocorre em oócitos em metáfase II na porção média ou distal da tuba uterina (Reynaud et al., 2006).

Recentemente, foi demonstrado que os oócitos na espécie canina não podem ser penetrados pelo espermatozoide enquanto estão ainda imaturos (Fontbonne e Malandain, 2006; Lévy e Fontbonne, 2007). A sobrevivência dos oócitos maduros se estende por um a dois dias (Phemister et al., 1973; Jeffcoate e Lindsay, 1989; Tsutsui, 1989;

Hase et al., 2000; Fontbonne e Malandain, 2006; Reynaud et al., 2006) ou quatro a cinco dias até iniciarem o processo de degeneração (Tsutsui, 1989; England e Concannon, 2002; Tsumagari et al., 2003). O período ótimo de fertilização ocorre entre dois e quatro dias após a ovulação, quando os oócitos estão completamente maduros e ainda não sofreram degeneração (Fontbonne e Malandain, 2006; Lévy e Fontbonne, 2007). Dessa forma, considera-se que o período fértil na fêmea canina ocorra do quarto ao sétimo dias após o pico de LH (Hase et al., 2000).

Vários parâmetros são utilizados para determinação do período ovulatório, entre eles os aspectos clínicos e reprodutivos, citologia vaginal, endoscopia vaginal ou vaginoscopia, dosagens hormonais e, mais recentemente, a ultra-sonografia ovariana (England e Concannon, 2002; Fontbonne e Malandain, 2006; Lévy e Fontbonne, 2007). Parâmetros clínicos como a data de início do edema de vulva, quantidade e aspecto da secreção vulvar, lateralização da cauda ao toque da região perineal ou aceitação da monta, não são suficientemente precisos para detectar a ocorrência e o período da ovulação, pois o aparecimento dessas alterações varia muito entre as cadelas, e as mesmas podem aceitar ou não a monta de diferentes machos durante o mesmo estro (Wildt et al., 1978; England e Concannon, 2002; Fontbonne e Malandain, 2006; Reynaud et al., 2006). Além disso, a mudança para o comportamento receptivo característico do estro também não é confiável para se detectar a ovulação, pois essa mudança comportamental normalmente ocorre um dia após o pico de LH, mas pode ocorrer desde três dias antes até cinco dias depois do pico, ou ainda pode não ocorrer apesar das mudanças endócrinas normais (Concannon, 2004).

A citologia vaginal não deve ser usada para a detecção prospectiva da ovulação. A mudança na citologia vaginal é observada no

final do estro, aproximadamente cinco dias após a ovulação, quando ocorre o súbito aumento das células intermediárias e parabasais. Dessa maneira, essa técnica somente auxilia a detecção da ovulação retrospectivamente (Concannon et al., 1989; Wright, 1990; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Fontbonne e Malandain, 2006). Segundo Blendinger (2007a), a mudança para o diestro observada na citologia pode ocorrer de sete a dez dias após o pico de LH.

A vaginoscopia para o manejo reprodutivo consiste na observação das mudanças da mucosa vaginal durante proestro e estro, considerando os seguintes aspectos: contornos das pregas vaginais, coloração da mucosa, presença e tipo de fluidos. Porém, esse método não permite de maneira acurada a determinação do dia exato da ovulação, pois apesar das mudanças observadas no aspecto da mucosa vaginal serem progressivas, as mesmas não ocorrem em um momento determinado do proestro e do estro, podendo variar entre os animais observados (Lindsay e Concannon, 1986; England e Concannon, 2002; Fontbonne e Malandain, 2006). No início do proestro, as pregas vaginais encontram-se edemaciadas e túrgidas, e a mucosa rósea sob o efeito do estrógeno. Com a progressão para o estro, as pregas vaginais perdem a turgidez, tornando-se “enrugadas” e anguladas, enquanto a mucosa torna-se pálida e menos rósea. Esse fenômeno é chamado de crenulação das pregas vaginais (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Brearley et al., 1991; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Silva et al., 2003; Blendinger, 2007a).

As dosagens hormonais são os métodos mais eficazes na determinação do período ovulatório em cadelas. As dosagens de LH são ideais em teoria, mas a detecção do momento do pico de LH requer a obtenção de pelo menos duas amostras de sangue por dia todos os dias e, em muitos países, não há kits comerciais disponíveis para sua

dosagem. O exame laboratorial consiste em um teste de radioimuniensaio caro e demorado (England e Concannon, 2002; Fontbonne e Malandain, 2006; Reynaud et al., 2006). Existe, no mercado internacional, um teste semi-quantitativo com ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de LH, que deve ser realizado todos os dias, tem um tempo de validade curto e necessita de dosagem de progesterona para verificar a sua acurácia, sendo assim pouco utilizado (Kustritz, 2001).

A dosagem da progesterona pode ser uma maneira mais prática de prever o dia do pico de LH e em consequência detectar o dia da ovulação (Jeffcoate e Lindsay, 1989). Os métodos para dosagem desse hormônio são radioimunoensaio (Chapwanya et al., 2008) e quimioluminescência (Volkman, 2006), mas estão disponíveis também os testes semi-quantitativos com ELISA, que apresentam resultados rápidos, porém com acurácia reduzida (Kustritz, 2001; Chapwanya et al., 2008). Segundo Volkman (2006), a concentração sérica de progesterona é reduzida quando a amostra de sangue total é refrigerada a 4°C logo após a coleta em comparação com a que é mantida em temperatura ambiente por duas horas antes de ser submetida à refrigeração.

A concentração plasmática de progesterona começa a aumentar rapidamente além dos níveis basais aproximadamente dois dias antes da ovulação, durante o pico de LH, por isso a realização de dosagens seriadas permite a antecipação da ovulação em um ou dois dias e, se continuada, permite a confirmação que a ovulação ocorreu e a detecção do período ovulatório (Wilson, 1993; England e Concannon, 2002).

Segundo Thuróczy et al. (2003), como a fonte de progesterona antes da ovulação é constituída pelos folículos pré-ovulatórios em desenvolvimento, e estes são estimulados pelo LH, a dosagem de progesterona realizada pela manhã

normalmente resulta em uma concentração inferior desse hormônio quando comparada à concentração da tarde, pois a melatonina liberada durante a noite apresenta um efeito inibitório sobre a liberação do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) e, por consequência, sobre o LH. Durante e após a ovulação, a diferença diurna nas concentrações séricas de progesterona não ocorre, pois sua fonte passa a ser os corpos lúteos independentes das gonadotrofinas para a síntese desse hormônio.

A concentração plasmática de progesterona no dia do pico de LH varia de acordo com os autores, encontrando-se em torno de $1,37 \pm 0,1$ ng/ml (Johnston et al., 2001) ou entre 2 e 4 ng/ml (Wright, 1990; England e Concannon, 2002; Tsumagari et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004; Fontbonne e Malandain, 2006). Durante o período ovulatório, Hase et al. (2000) observaram que o nível desse hormônio encontrava-se entre 1,88 e 2,81 ng/ml (2,34 ng/ml, em média). Enquanto, Wright (1990) e Lévy e Fontbonne (2007) observaram, respectivamente, concentrações de progesterona entre 4 e 10 ng/ml (média de 5,5 ng/ml) e média de 6 ng/ml durante a ovulação.

Os autores recomendam a realização de dosagens de progesterona diariamente ou em dias alternados até que um valor indique a ocorrência da ovulação (Hase et al., 2000; Fontbonne e Malandain, 2006; Chapwanya et al., 2008). Já foi demonstrado que o nível de progesterona plasmático no momento da ovulação apresenta pequena variação, independente da raça (Marsello et al., 2004). Por conseguinte, as dosagens de progesterona parecem ser uma das técnicas mais confiáveis para detectar a ovulação na cadela (Concannon et al., 1977; England e Concannon, 2002; Hase et al., 2000; Fontbonne e Malandain, 2006; Lévy e Fontbonne, 2007).

A ultra-sonografia ovariana é a técnica mais nova para detecção da ovulação na cadela, sendo utilizada quando se necessita determinar o dia da ovulação de maneira precisa (Fontbonne e Malandain, 2006). Entretanto, as imagens ultra-sonográficas dos ovários são mais difíceis de analisar do que em outras espécies. Estudos anteriores mostraram que as imagens ultra-sonográficas dos folículos ovarianos logo antes e logo após a ovulação são muito semelhantes (England e Concannon, 2002; England et al., 2003; Lévy e Fontbonne), alguns folículos não se rompem durante a ovulação, e ainda alguns folículos permanecem sem ovular ao final da ovulação (Hayer et al., 1993; Fontbonne e Malandain, 2006; Lévy e Fontbonne, 2007). Diante dessas dificuldades, recomenda-se realizar o exame ultra-sonográfico pelo menos duas vezes ao dia para determinar com precisão a ocorrência da ovulação (England e Yeager, 1993). Fontbonne e Malandain (2006) detectaram o dia da ovulação em 91,7% (44 de 48) das cadelas examinadas. Nesse estudo, no entanto, quatro cadelas, todas de raças de grande porte (Pastor Alemão, Pastor Belga, Retriever do Labrador e Dogo Argentino), apresentaram aspectos ovarianos imprecisos no período ovulatório.

A determinação precisa dos eventos peri-ovulatórios é importante para se realizar o manejo reprodutivo e IA, pois permite o estabelecer o melhor momento para o diagnóstico de gestacional por ultra-sonografia e palpação abdominal, e também prever a data do parto (Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Meyers-Wallen, 2007).

3.3 Coleta de sêmen e avaliação espermática

A seleção de reprodutores deve ser feita após detalhada anamnese e criterioso exame clínico geral e andrológico. O exame andrológico inclui a inspeção e palpação dos

órgãos reprodutivos, coleta e avaliação do sêmen e inspeção do comportamento de monta (libido), podendo ter continuidade com testes hormonais e análises cromossômicas (Silva et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004).

O método de escolha para coleta do sêmen é a manipulação digital do pênis, devendo-se evitar o contato da luva de látex com o sêmen fresco, de modo a evitar o decréscimo da motilidade espermática causado por esse material (Silva et al., 2003).

Os resultados da avaliação espermática podem ser influenciados por fatores como: técnica e momento de coleta do sêmen, concentração espermática da amostra, tempo decorrido entre a coleta e a avaliação, temperatura em que a amostra foi mantida, equipamento usado, entre outros (Kustritz, 2007).

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 macroscópica compreende volume, coloração e pH do ejaculado. A avaliação microscópica inclui motilidade retilínea progressiva, vigor espermático, concentração espermática por ejaculado, morfologia ou patologia espermática, citologia e cultura do sêmen. O exame andrológico é indicado para a avaliação da qualidade do sêmen utilizado na IA ou para criopreservação, bem como nos casos de subfertilidade e patologias do sistema reprodutor (Vannucchi et al., 1998; Johnston et al., 2001; Silva et al., 2003; Feldman e Nelson, 2004).

O padrão seminal mínimo necessário para sua utilização em IA é: motilidade progressiva espermática acima de 70%, vigor acima de quatro (escala de zero a cinco), número total de espermatozoides por ejaculado superior a 250 milhões de

espermatozóides viáveis e acima de 80% dos espermatozóides livres de patologias espermáticas (Santos e Vannucchi, 1997; Gabaldi e Lopes, 1998; Silva et al., 2003; Kustritz, 2007).

A concentração espermática está relacionada ao volume de sêmen coletado, e pode ser determinada em câmara hematimétrica (câmara de Neubauer) sendo a contagem em microscopia óptica, que é a técnica comumente usada (Vannucchi et al., 1998; Kustritz, 2007). A concentração espermática pode também ser determinada por espectrofotometria (Cardoso et al., 2003). Deve-se calcular o número total de espermatozóides do ejaculado multiplicando-se o número de espermatozóides por mililitro pelo volume do ejaculado. O número total de espermatozóides diminui quando a frequência de coletas de sêmen for em intervalos menores de 48 horas, devido à depleção das reservas epididimais. No entanto, cães normais podem ejacular amostras oligospermicas ou azoospermicas devido a condições de estresse ou apreensão, fatores ambientais, dor, ou ainda pela ausência de uma fêmea em estro ou estimulação insuficiente do macho (Martinez, 2004; Johnson, 2006; Kustritz, 2007). Por outro lado, o repouso sexual prolongado pode levar à observação de amostras com maior porcentagem de espermatozóides morfologicamente anormais, devido à presença de espermatozóides velhos nos epidídimos (Martinez, 2004; Kustritz, 2007).

As anormalidades morfológicas podem ser classificadas em primárias (que ocorrem durante a espermatogênese) ou secundárias (que ocorrem durante a maturação espermática no epidídimo ou na preparação da amostra) ou ainda em maiores ou menores. Os defeitos maiores são conseqüências de anomalias ao nível do testículo e epidídimo, e podem comprometer seriamente a fertilidade. São denominadas

menores, as anomalias espermáticas menos importantes, não ligadas diretamente a processos patológicos dos testículos. Em cães, o sêmen é considerado normal quando apresenta porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais superior a 80% (Seagar, 1986; Feldman e Nelson, 2004; Cardoso et al., 2005; Kustritz, 2007). A morfologia espermática pode ser avaliada após coloração dos espermatozóides com corante eosina-nigrosina ou corantes diferenciais para o acrossoma; ou ainda em preparações úmidas, fixando os espermatozóides em solução formol-salina e analisando-os em microscópio de contraste de fase (Martinez, 2004).

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 podem influenciar na viabilidade do sêmen após o descongelamento (Farstad, 2000).

3.4 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação pode ser realizado pela palpação abdominal, ultra-sonografia, radiografia e pela detecção do hormônio relaxina no sangue (Johnston et al., 2001; Luz et al., 2005; Freitas e Silva, 2008; Johnson, 2008).

Mediante a palpação abdominal, com a cadela em estação ou em decúbito lateral, é possível palpar as vesículas embrionárias com aproximadamente 1 cm de diâmetro 20 dias após o pico de LH (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004; Concannon, 2005; Freitas e Silva, 2008). O diagnóstico gestacional por palpação pode ser difícil em cadelas grandes, obesas, com abdome tenso ou quando há apenas um ou poucos fetos e, principalmente quando localizados na porção cranial do útero (Johnston et al., 2001).

A ultra-sonografia é um exame seguro e preciso para o diagnóstico de gestação que não apresenta efeitos secundários nocivos, visto que as ondas acústicas são consideradas inócuas para a fêmea, fetos e operador (Freitas e Silva, 2008), constituindo assim um excelente método para detecção da prenhez. Tem a vantagem de acessar a taxa de crescimento e a viabilidade fetal. O diagnóstico de prenhez é mais confiável se realizada a partir de 24 a 28 dias após a inseminação artificial (Johnston et al., 2001; Concannon e Verstegen, 2004; Concannon, 2005; Johnson, 2008). A placenta na espécie canina é do tipo endotélio-corial, e a cinta de tecido trofoblástico fetal que dá origem à placenta zonária pode ser visualizada na ultra-sonografia 28 dias após o pico de LH (Concannon, 2005; Freitas e Silva, 2008).

A ultra-sonografia apresenta limitações tais como: qualidade do equipamento, experiência do operador, relaxamento da paciente, frequência respiratória e tamanho da cadela (Lopate, 2008).

A radiografia pode ser realizada para o diagnóstico de gestação em cadelas a partir de 31 dias após o pico de LH, quando é possível visualizar os aumentos de volume esféricos no lúmen uterino, porém a primeira evidência de mineralização óssea só pode ser visualizada após 45 dias, em média, do pico de LH (Johnston et al., 2001; Freitas e Silva, 2008; Lopate, 2008). Além disso, segundo Freitas e Silva (2008), os fetos são sensíveis aos efeitos da radiação ionizante durante a organogênese, que ocorre no primeiro terço da gestação, e por isso a radiografia deve ser evitada nesse período.

A relaxina é um hormônio produzido principalmente pela placenta canina e, conseqüentemente, é específica da gestação. Durante o ciclo estral normal, na pseudogestação ou em cadelas submetidas à histerectomia, a relaxina não é identificada no soro sanguíneo (Johnston et al., 2001;

Freitas e Silva, 2008; Johnson, 2008). Já na fêmea gestante, tanto a placenta quanto os ovários secretam relaxina, sendo que a contribuição da placenta é proporcionalmente maior na obtenção do nível sérico total. A relaxina imunorreativa é detectada inicialmente no soro a partir do 18º dia de gestação, alcançando o nível máximo por volta da sexta e oitava semanas. Nos Estados Unidos, está disponível um teste para mensuração da concentração de relaxina que permite a diferenciação entre cadelas gestantes e não-gestantes. O seu uso é indicado para o 24º dia após o acasalamento (Witness™, Synbiotics Corporation, San Diego, CA, USA). Podem também ocorrer falso-positivos se a prova for realizada pouco tempo após abortamento ou reabsorção (Freitas e Silva, 2008).

3.5 Previsão da data do parto

A previsão da data do parto é útil para estabelecer o manejo do parto e programar operações cesarianas (Kutzler et al., 2003a; Kim et al., 2007). Pode ser feita com base nas dosagens hormonais e determinação da data do pico de LH ou com base nos achados ultra-sonográficos durante a gestação (Johnston et al., 2001; Kutzler et al., 2003a; Kim et al., 2007). A data da primeira monta natural ou inseminação artificial e a data de início do estro comportamental não são parâmetros confiáveis para se prever a data do parto em cadelas (Kutzler et al., 2003a; Kim et al., 2007; Lopate, 2008). Isto devido a alguns fatores: grande variabilidade na duração do ciclo estral da cadela e no comportamento receptivo ao macho, e ao longo tempo de sobrevivência dos espermatozoides no trato genital da cadela (Lopate, 2008).

A estimativa da idade gestacional em cadelas é possível, pois a taxa de desenvolvimento embriológico canina é sincrônica e diretamente relacionada com o pico pré-ovulatório de LH (Kutzler et al., 2003a; Johnson, 2008). O parto ocorre em

média 65 dias após o pico de LH (Johnston et al., 2001; Kutzler et al., 2003a; Kutzler et al., 2003b; Concannon, 2005; Kim et al., 2007; Lopate, 2008). Dessa forma, a idade gestacional e, por conseguinte, a data do parto podem ser determinadas com precisão quando associadas ao dia do pico de LH (Kutzler et al., 2003a; Johnson, 2008).

A previsão da data do parto pode ser feita com ultra-sonografia trans-abdominal independente do peso corporal da cadela e do tamanho da ninhada, utilizando-se fatores de correção para raças de pequeno porte (mais um dia) e porte gigante (menos dois dias) (Johnston et al., 2001; Kutzler et al., 2003b; Kim et al., 2007; Lopate, 2008). Esse exame apresenta maior precisão quando associado às informações da data de ocorrência do pico de LH fornecidas pelas dosagens seriadas de progesterona (Kim et al., 2007). A previsão mais precisa é obtida quando os fetos são medidos 30 dias após o pico de LH, devendo-se medir pelo menos dois fetos (Son et al., 2001; Kutzler et al., 2003b; Kim et al., 2007; Lopate, 2008).

A idade gestacional estimada pela ultra-sonografia abdominal utiliza medidas fetais e avalia a progressão do desenvolvimento dos órgãos fetais. A prenhez pode ser diagnosticada em 19 a 21 dias após o pico de LH, quando os fetos estão com aproximadamente 1 cm de diâmetro. As medidas para estimar a data do parto realizadas entre os dias 19 e 37 incluem: o diâmetro do saco gestacional (cavidade coriônica interna ou diâmetro uterino externo) e o comprimento cabeça-pelve. Após o 37º dia, as medidas realizadas são: diâmetro biparietal, diâmetro torácico e diâmetro corporal de dois ou mais fetos (Son et al., 2001; Freitas e Silva, 2008; Lopate, 2008). A idade gestacional pode ser estimada avaliando-se o desenvolvimento dos órgãos fetais. Os batimentos cardíacos podem ser detectados e os movimentos do feto podem ser observados a partir do Dia 23. A frequência cardíaca fetal menor do

que duas vezes a frequência cardíaca da mãe já é indicativa de estresse fetal (England et al., 2003). A bexiga pode ser vista entre os dias 35 e 39, o estômago entre 36 e 39 dias, os rins e olhos entre 39 e 47 dias e os intestinos entre 57 e 63 dias. O peristaltismo intestinal se torna evidente entre 62 e 64 dias. A ocorrência de taquipnéia da cadela durante o exame ultra-sonográfico pode dificultar a visualização do peristaltismo intestinal (Lopate, 2008).

O parto ocorre normalmente 64 a 66 dias após o pico de LH, que pode ser determinado pela concentração de progesterona (Johnston et al., 2001; Kutzler et al., 2003a; Eilts et al., 2005; Kim et al., 2007; Johnson, 2008). Kutzler et al. (2003a) e Kim et al. (2007) obtiveram resultados similares ao determinarem que o Dia zero foi aquele em que a concentração de progesterona atingiu valores entre 1,5 ng/ml e 2,2 ng/ml e esses autores conseguiram 90% de acerto na previsão da data do parto com variação de ± 2 dias e 100% de acerto com variação de ± 3 dias, independente do peso corporal e do tamanho da ninhada.

O uso das dosagens de progesterona pré-ovulatórias para estimar a data do parto é adequado para a prática clínica, uma vez que pode ser aplicado a todas as gestações, independente do peso corporal e do tamanho da ninhada, e não requer fatores de correção ou habilidades técnicas adicionais (Kutzler et al., 2003a; Tsutsui et al., 2006).

Após a determinação da data do pico de LH, a cesariana pode ser realizada após 63 dias do pico (Smith, 2007), mas se possível a cesariana eletiva deve ser agendada para o Dia 65 após o pico (Kim et al., 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) sob o protocolo nº 204/2006 (Anexo 1), estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo referido comitê.

4.1 Animais

Neste estudo, foram utilizadas 10 cadelas híbridas da raça Retriever do Labrador, sete pluríparas e três nulíparas, com idade variando entre 18 meses e seis anos, e peso entre 27,8 e 37,6 kg. As cadelas apresentaram histórico de ciclos reprodutivos normais, baseados nos ciclos estrais, gestações e partos anteriores. Apenas uma das cadelas pluríparas, com seis anos de idade, não havia apresentado gestação no ciclo anterior após inseminação artificial intra-vaginal profunda com sêmen fresco.

Foram utilizados cinco cães doadores de sêmen da raça Retriever do Labrador, com idade entre um e quatro anos, submetidos previamente a avaliações andrológicas e com histórico de cobertura com outras fêmeas e prenhez positiva. Todos os animais (fêmeas e machos) utilizados no presente estudo pertencem a um canil comercial¹, onde recebiam a mesma dieta e estiveram submetidos às mesmas condições ambientais e de manejo adotado pelo canil.

Durante o acompanhamento do ciclo estral e nos dias de inseminação artificial, as cadelas foram mantidas em canis de alvenaria com 2 m x 3 m de área coberta e 2 m x 2 m de área com exposição ao sol. Os animais foram distribuídos em grupos de duas ou três cadelas por canil. Desde os sete dias que antecederam o parto até o desmame dos filhotes, as cadelas foram mantidas individualmente em canis similares aos

anteriormente descritos. Os machos foram mantidos em canis de alvenaria (com as mesmas medidas de área) separados dos canis das fêmeas, e distribuídos individualmente ou em dois cães por baia, dependendo do temperamento do animal.

Todos os animais receberam dieta constituída de ração seca comercial² para cães duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

4.2 Determinação do período de inseminação artificial

O acompanhamento reprodutivo iniciou-se ao final do anestro e início do proestro, quando então se iniciaram os procedimentos deste trabalho. As fases de proestro e estro foram determinadas por meio de evidências clínicas e reprodutivas, bem como dos exames de citologia vaginal e dosagens séricas de progesterona. A fase fértil (período ovulatório) foi estabelecida por meio da citologia vaginal e dosagem de progesterona, possibilitando a inseminação no período ótimo do cio (England e Concannon, 2002).

O início da fase de proestro foi identificado a partir de observações diárias de comportamentos e parâmetros reprodutivos como atração de machos, recusa à monta, agressividade da fêmea, edema e secreção vulvar sanguinolenta, elevação da vulva e lateralização da cauda ao toque da região perineal. Todas as informações foram registradas em formulário próprio (Anexo 3). Uma vez determinado o início do proestro, foram mantidas as observações citadas anteriormente e foram realizadas, a cada 48 horas, citologia vaginal e dosagem de progesterona sérica, até o final do período de inseminação artificial.

As amostras de sangue para dosagem de progesterona foram obtidas por punção da

¹ Canil Zuo's, Itabirito – MG, Brasil.

² Jolly Dog Premium Dog Food, Alimentos Brasileiros Ltda, Bragança Paulista – SP, Brasil.

veia cefálica e colocadas em frasco sem anti-coagulante, permanecendo à temperatura ambiente por duas horas antes de serem refrigeradas (Concannon, 2004; Volkmann, 2006) a 8°C até o momento do envio para o laboratório. As dosagens desse hormônio foram realizadas pelo método de quimioluminescência no Laboratório Hermes Pardini³ (Volkmann, 2006).

As amostras de citologia vaginal foram coletadas na porção caudo-dorsal da vagina com um swab úmido, com o auxílio de espéculo vaginal, e encaminhadas ao Laboratório de Histopatologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foram coradas pela técnica de Harris-Shorr (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004). A leitura das lâminas foi realizada por microscopia óptica, com contagem diferencial de células parabasais, intermediárias, superficiais, eritrócitos, polimorfonucleares e bactérias.

O primeiro dia das inseminações foi aquele em que as cadelas estiveram receptivas ao macho, apresentaram 80 % ou mais de células superficiais na citologia vaginal e a dosagem de progesterona encontrava-se entre 4 e 10 ng/ml, indicando período ovulatório (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Hase et al., 2000; England e Concannon, 2002; Pretzer et al., 2006).

4.3 Coleta de sêmen e avaliação espermática

Os cães doadores foram submetidos a exames clínico e andrológico completos incluindo avaliação macroscópica do sêmen (volume, odor e coloração) e microscópica (motilidade total e progressiva, vigor espermático, concentração e morfologia espermática) que foram realizados previamente ao início do experimento.

A coleta de sêmen foi realizada imediatamente antes da IA por meio de manipulação digital do pênis, segundo a técnica descrita por Linde-Forsberg (1991). A primeira e a segunda frações do ejaculado, identificadas pela coloração, foram colhidas em um saco de polietileno de 28,5 cm x 14 cm. O volume do ejaculado foi medido por meio de aspiração em seringa graduada. Imediatamente após a coleta do sêmen, uma amostra foi coletada para avaliação microscópica e para determinação da concentração espermática e avaliação da morfologia.

Procedeu-se então a colocação de uma alíquota de 10µL de sêmen entre lâmina e lamínula e a avaliação em microscopia óptica da motilidade total e progressiva e do vigor. A motilidade e o vigor foram avaliados subjetivamente em uma escala de zero a 100% e de zero a cinco, respectivamente. A concentração espermática foi determinada em câmara hematimétrica (câmara de Neubauer) e, a morfologia espermática, avaliada pela técnica da preparação úmida, com avaliação em microscópio óptico de contraste de fase posteriormente às inseminações. As amostras de sêmen dos cães doadores que foram utilizadas obedeceram aos seguintes critérios: motilidade total maior ou igual a 70%, vigor maior ou igual a 3 (Santos e Vannucchi, 1997; Gabaldi e Lopes, 1998; Silva et al, 2003; Kustritz, 2007).

4.4 Inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia

As cadelas foram submetidas à inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia três vezes durante o estro, com intervalos de 48 horas (Meyers-Wallen, 2007).

O volume inseminante foi fixado em, no máximo, três mililitros de modo a evitar a ocorrência de refluxo, sendo que a dose inseminante (em milhões de

³ Instituto Hermes Pardini – Divisão Veterinária, Belo Horizonte, Minas Gerais.

espermatozoides viáveis) por inseminação foi determinada posteriormente ao término do procedimento de inseminação.

Todos os procedimentos de IA foram gravados em fita mini-DV de filmadora digital que estava acoplada ao equipamento endoscópico (especificado no item 4.5 do Material e Métodos).

- **Técnica de inseminação artificial**

Para a inseminação, utilizou-se o sêmen a fresco, coletado conforme descrito no item 4.3. Logo após a coleta, um volume máximo de três mililitros de sêmen foi depositado no interior do útero através da cateterização não

cirúrgica da cérvix com visibilização endoscópica. No momento da inseminação, a cadela foi posicionada em estação sobre uma mesa de superfície antiderrapante com inclinação de aproximadamente 30°, de modo que o posterior da cadela ficasse na porção mais elevada da mesa (Fig. 4). A cadela foi contida manualmente sobre a mesa por auxiliares. O procedimento foi realizado no Bloco Cirúrgico de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UFGM, uma vez que o equipamento laparoscópico utilizado encontrava-se nesse local. Esse local consistiu em um ambiente tranquilo e não houve necessidade de administração de qualquer medicação pré-anestésica ou anestesia.



Figura 4: Posicionamento da cadela da raça Retriever do Labrador em estação com contenção manual por auxiliares, sobre a mesa de superfície anti-derrapante inclinada em aproximadamente 30°, durante a inseminação artificial intra-uterina transcervical endoscópica.

Após a limpeza externa da vulva com compressa cirúrgica, o endoscópio foi introduzido pela comissura dorsal da vulva evitando-se a sensível região do clitóris, localizada na porção ventral. O ângulo de introdução do endoscópio considerou a inclinação dorsal do vestíbulo, de modo a evitar o orifício uretral. A visibilização das pregas vaginais confirmou a posição correta do endoscópio, que foi introduzido sem resistência, evidenciando a área paracervical onde poderia haver redução do diâmetro do

lúmen vaginal que dificultaria a passagem do endoscópio. O tubérculo cervical e o orifício cervical externo foram visibilizados e identificados, e procedeu-se então ao direcionamento do endoscópio e a introdução do cateter pelo canal cervical com deposição lenta do sêmen, observando a ocorrência ou não de refluxo. Após a introdução do sêmen, foi colocado 1,2 ml de ar para preenchimento do lúmen do cateter e deposição do sêmen remanescente no mesmo. Após a deposição do sêmen e a

remoção do cateter e do endoscópio, a região posterior da cadela foi mantida elevada por 15 minutos, para minimizar o refluxo, e a região perineal estimulada manualmente.

Durante a execução da técnica de inseminação artificial intra-uterina transcervical, foram avaliadas as seguintes particularidades do procedimento: dificuldade de cateterização do óstio cervical, resistência à deposição do sêmen, ocorrência de refluxo de sêmen, tempo de introdução do cateter e duração total do procedimento, que foram registradas em formulário próprio (Anexo 4). Além disso, foram observadas a presença ou não de secreção vaginal sanguinolenta, aspecto das pregas vaginais (índice de crenulação), e posição do óstio cervical (direcionado ventralmente ou ventro-lateralmente) (Anexo 4) que foram avaliados pelas imagens no monitor.

Nos casos em que a secreção vaginal sanguinolenta dificultou a visualização do óstio cervical, a secreção foi drenada através de aspiração com seringa acoplada a um cateter uretral de PVC introduzido no outro canal de trabalho da camisa endoscópica.

- **Dificuldade de cateterização do óstio cervical**

No que se refere à dificuldade de transposição da cérvix (ou dificuldade de cateterização do óstio cervical), determinou-se o seguinte escore:

- 0 – Ausente;
- 1 – discreta: necessidade de manipulação do tubérculo cervical com a extremidade do endoscópio;
- 2 – moderada: necessidade de manipulação do tubérculo cervical com a extremidade do endoscópio e do cateter;
- 3 – acentuada: necessidade de manipulação do tubérculo cervical

com a extremidade do endoscópio e do cateter além de pressionar o endoscópio para atingir uma maior profundidade na vagina devido à posição profunda do tubérculo vaginal.

- **Resistência à deposição do sêmen**

No que se refere à resistência à deposição do sêmen durante a inseminação artificial transcervical intra-uterina, determinou-se o seguinte escore:

- 0 – Ausente;
- 1 – discreta: presença de resistência no final da deposição intra-uterina do sêmen;
- 2 – moderada: necessidade de reposicionamento do cateter, para permitir a deposição intra-uterina do sêmen sem resistência;
- 3 – acentuada: necessidade de reposicionamento do cateter, com permanência de resistência à deposição intra-uterina do sêmen.

- **Refluxo de sêmen**

A ocorrência de refluxo seminal foi registrada pela imagem do sêmen refluindo através do óstio cervical ao redor do cateter ainda durante a deposição intra-uterina do sêmen, segundo o escore:

- 0 – Ausente
- 1 – Presente

- **Tempo de duração do procedimento**

A duração total do procedimento foi considerada desde a introdução do endoscópio pela vulva até a retirada do mesmo após a IA.

O tempo de introdução do cateter foi considerado desde o início do procedimento (a partir da introdução do endoscópio na vulva) até a introdução do cateter no óstio cervical.

- **Índice de crenulação da mucosa vaginal**

A determinação do índice de crenulação baseou-se no escore a seguir (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Brearley et al, 1991; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Feldman e Nelson, 2004):

- 0 – Pregas vaginais longitudinais aumentadas de volume, edemaciadas, com a superfície arredondada e lisa, e de coloração rosada ou rosa-esbranquiçada
- 1 – pregas vaginais discretamente murchas, sem a angulação das bordas, de coloração rosada ou rosa-esbranquiçada
- 2 – mucosa vaginal enrugada com angulação discreta das pregas vaginais e coloração pálida, esbranquiçada
- 3 – mucosa vaginal enrugada com angulação evidente das pregas vaginais, e formação de sulcos e pregas secundárias (transversais), com coloração pálida, esbranquiçada
- 4 – pregas vaginais enrugadas com as bordas acentuadamente anguladas e irregulares, com coloração esbranquiçada
- 5 – mucosa vaginal adelgada, com pregas murchas de bordas arredondadas (menos anguladas) e de coloração rósea

4.5 Equipamento

Foi utilizado o equipamento laparoscópico KARL STORZ⁴ constituído por um monitor de 14”, uma câmara Telecam Dx (Fig. 5B); uma fonte de luz fria Xenon, um cabo de fibra óptica (3,5 mm e 180 cm de comprimento), um cisto-uretroscópio rígido KARL STORZ 30 cm de comprimento, 4 mm de diâmetro e 30° (Fig. 5A), uma camisa endoscópica com diâmetro de 22 fr (Fig.

⁴ KARL-STORZ® GmbH&Co, Tuttlingen, Germany.

5A); uma peça guia com canal para instrumentos de até 10 fr. (Fig. 5A) e cateteres ureterais de neoplex do tipo “flush”⁵ de 8 fr, além de filmadora digital⁶ para registro das imagens (Fig. 5B).

O endoscópio, a camisa endoscópica e a peça guia com canal de trabalho foram submetidos a esterilização em autoclave de ciclo rápido⁷, a 135°C durante 14 minutos, imediatamente antes de cada procedimento de inseminação.

Após o término de cada procedimento, o endoscópio, a camisa endoscópica e a peça guia foram lavadas e higienizadas com escova de clorexidine e água corrente, e então secadas com ar comprimido.

4.6 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico gestacional foi realizado entre 26 e 51 dias após a data do pico de LH por meio de palpação abdominal e confirmado por exame ultra-sonográfico para identificação das vesículas embrionárias e avaliação da viabilidade dos conceitos, utilizando aparelho de ultra-som Aloka® SSD-500⁸ e probe de 7,5 Hz⁹. As cadelas permaneceram no canil¹ durante todo o período de observação deste estudo sob as mesmas condições e cuidados e tiveram a gestação acompanhada até o momento do parto.

⁵ Referência: ACP2 08, CH 08 fr. Porgès S.A.S.®, Le Plessis, France.

⁶ JVC® Digital Vídeo Câmera, Mini DV, Japão.

⁷ Statim 2000®, ScicCan, Canadá.

⁸ Aloka Co; Ltd®. Tóquio, Japão.

⁹ Modelo: UST-55121-7,5. Aloka Co; Ltd®.

Tóquio, Japão.

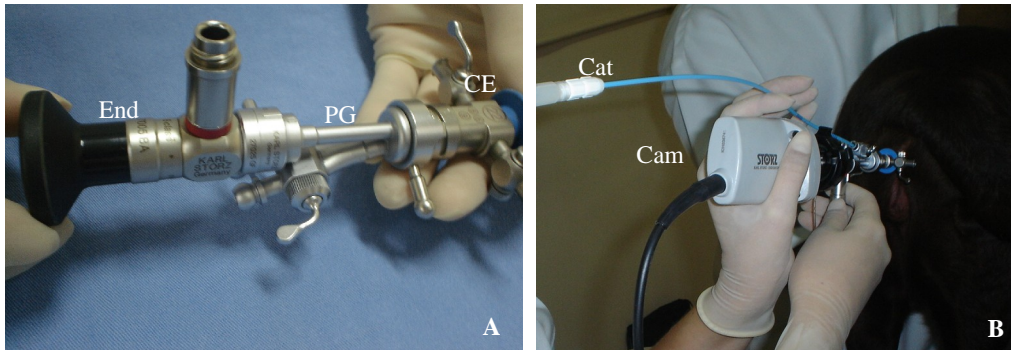


Figura 5: A- Endoscópio (End), peça guia (PG) e camisa endoscópica (CE); B- cateter (Cat) e câmera (Cam) utilizados para a realização da inseminação artificial intra-uterina transcervical endoscópica em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

4.7 Análise estatística

O delineamento para determinação de distinção entre os 3 momentos de inseminação foi em Blocos ao Acaso, onde cada animal recebeu todos os tratamentos (IA).

As variáveis categóricas e as variáveis quantitativas que não mantinham normalidade e homocedasticidades foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis para comparação das medianas dos referidos tratamentos.

Os estudos de correlações foram determinados pelas análises de Correlação de Spearman e Correlação de Pearson para variáveis categóricas e quantitativas, respectivamente.

Estudos de dispersão de frequência foram avaliados por tabelas de contingência e a análise feita pelo Teste Exato de Fisher.

Todas as análises foram feitas com o software de uso livre SAEG Demonstrativo 9.1 (SAEG-d) (SAEG, 2007).

As análises estatísticas consideraram distinção estatística para valores de $p = 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de cadelas utilizado no presente estudo baseou-se na disponibilidade de animais no referido canil e atendeu ao delineamento estatístico. Vale destacar que a longa duração do ciclo estral na espécie canina dificulta significativamente a realização de estudos sobre a fertilidade nessa espécie, fato que também é relatado por Linde-Forsberg (2001) e Cardoso et al. (2005).

Os resultados de prenhez e tamanho das ninhadas das inseminações intra-uterinas transcervicais endoscópicas com sêmen fresco em dez cadelas da raça Retriever do Labrador estão dispostos na Tabela 1. A cadela 4, com diagnóstico de prenhez negativo, tinha seis anos de idade e histórico de ausência de prenhez após inseminação artificial intravaginal profunda com sêmen fresco no cio anterior e sem acompanhamento com citologia vaginal e dosagem de progesterona. Esta ocorrência está de acordo com o citado por Johnston et al. (2001), Feldman e Nelson (2004) e Thomassen et al. (2006), que afirmaram que as cadelas com mais de seis anos podem apresentar alterações uterinas que resultam em fertilidade reduzida.

O número médio de filhotes obtidos no presente estudo foi de $5,0 \pm 2,6$ filhotes (Tab. 1).

Tabela 1: Resultados (média \pm desvio padrão) de prenhez e tamanho das ninhadas após as inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais assistidas por endoscopia com sêmen fresco em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

Identificação da cadela	Nome da cadela	Identificação do macho	Nº filhotes
1	Zeta	A	6
2	Diana	B	6
3	Alice	A	10
4	Amarula	B	-
5	Íris	D	5
6	Gracie	E	7
7	Olga	A	4
8	Hanna	C	3
9	Sofie	A	3
10	Vida	A	1
Média \pm desvio padrão	-	-	$5,0 \pm 2,6$

5.1 Determinação do período de inseminação artificial

No presente estudo, observou-se edema e secreção vulvar sanguinolenta durante uma média de $9,4 \pm 3,3$ dias e $10,3 \pm 4,9$ dias, respectivamente, a partir do início do proestro. A elevação da vulva e a lateralização da cauda ao toque da região perineal foram inicialmente observadas em média nos dias $5,5 \pm 3,0$ e $6,6 \pm 3,2$, respectivamente, a partir do início do proestro. Enquanto que a permanência das cadelas em estação durante a monta e a aceitação da mesma ocorreram em média após $8,7 \pm 2,0$ e $9,1 \pm 2,3$ dias do início do proestro, respectivamente.

As mudanças comportamentais constituem o aspecto mais variável do ciclo estral, e essa variação do comportamento reprodutivo entre as cadelas se deve às mudanças endócrinas que controlam os aumentos nas gonadotropinas, entre elas o LH, que estão diretamente associadas ao comportamento da fêmea durante o estro (Jeffcoate e

Lindsay, 1989). A mudança para o comportamento receptivo característico do estro, que normalmente ocorre um dia após o pico de LH, pode ocorrer desde três dias antes até cinco dias depois do pico de LH, ou ainda pode não ocorrer apesar das mudanças endócrinas normais (Concannon, 2004). Algumas cadelas apresentam a mudança comportamental do proestro para o estro lenta ou intermitente, como observado na cadela 7, ao invés de uma mudança rápida e evidente. Outras podem demonstrar receptividade para alguns machos e para outros não, ou ainda podem aceitar o macho tardiamente, por volta de sete a oito dias após o pico de LH, e portanto muito tarde para realizar a inseminação (Concannon, 2004).

Segundo a literatura, o pico de LH ocorre no dia em que a concentração de progesterona sérica encontra-se em torno de 2 ng/ml (Hase et al., 2000; Kutzler et al., 2003a; Kim et al., 2007), portanto, no presente estudo, o pico de LH ocorreu em média $7,4 \pm 2,5$ dias após o início do proestro (Tab. 2).

O acompanhamento do cio das cadelas estudadas demonstrou variação individual nos parâmetros avaliados, principalmente naqueles comportamentais. A cadela 7 não permaneceu em estação durante o teste de aceitação do macho no período ovulatório, não apresentando comportamento receptivo à monta, enquanto a concentração sérica de progesterona estava entre 2,66 ng/ml e 12,39 ng/ml (Fig. 9; Anexo 2), e só veio a

apresentar-se receptiva à monta quatro dias após o pico de LH, quando a progesterona estava em 13,67 ng/ml, no décimo dia do cio (Fig. 9; Anexo 2).

Os resultados das dosagens de progesterona realizadas nos dias de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia das dez cadelas da raça Retriever do Labrador estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 2: Dia estimado de ocorrência do pico de LH (média \pm desvio padrão), com base na dosagem de progesterona, e em relação ao primeiro dia do proestro das dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas a inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais assistidas por endoscopia com sêmen fresco.

Identificação da cadela	Dia do pico de LH*	Dosagem de progesterona (ng/ml)
1	7	2,74
2	5	> 1,7 ; < 4,7 **
3	8	2,7
4	5	> 0,8 ; < 4,5 **
5	10	1,7
6	10	2,2
7	6	2,6
8	5	2,2
9	12	4,3
10	6	3,2
Média \pm desvio padrão	7,4 \pm 2,5	-

* Em dias a partir do início do proestro.

** Valores da progesterona no dia anterior e no dia seguinte ao suposto dia de ocorrência do pico de LH.

Tabela 3: Valores da progesterona sérica nos dias de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

Identificação da cadela	Dosagem de progesterona (ng/ml)		
	1ª IA	2ª IA	3ª IA
1	5,50	15,12	27,74
2	14,83	18,71	36,23
3	4,37	14,13	28,03
4	6,40	15,14	37,51
5	10,72	16,15	20,94
6	4,01	15,12	35,17
7	25,09	35,60	34,28
8	9,67	28,27	41,07
9	8,93	14,51	19,68
10	9,76	17,91	48,00
Média \pm desvio padrão	9,90 \pm 6,26 ^a	19,10 \pm 7,14 ^{a,b}	32,90 \pm 8,80 ^b

Teste de Kruskal-Wallis.

^{ab} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente ($p = 0,05$).

As figuras 6, 7 e 8 indicam os dias das três inseminações artificiais em relação ao pico de LH, à citologia vaginal com 80% ou mais de células superficiais e ao período de aceitação da monta.

Em nove cadelas (Fig. 6), a primeira inseminação artificial foi realizada em média 2 ± 1 dias após o dia do pico de LH, estimado com base na dosagem de progesterona (Tab. 2), em concordância com

o recomendado por England e Concannon (2002). Na primeira IA, como critério estabelecido no item 4.2, as cadelas estavam receptivas ao macho, apresentaram 80% ou mais de células superficiais na citologia vaginal (Fig. 6) e a dosagem de progesterona encontrava-se entre 4 e 10 ng/ml, indicando período ovulatório (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Hase et al., 2000; England e Concannon, 2002; Pretzer et al., 2006).

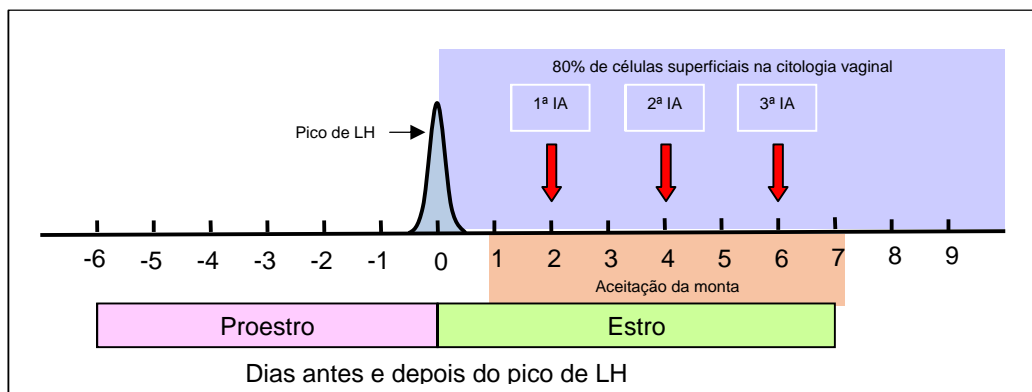


Figura 6: Cronologia das inseminações artificiais em nove das dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas à IA intra-uterina transcervical assistida por endoscopia, considerando o período de observação da citologia vaginal com pelo menos 80% de células superficiais e o comportamento de aceitação da monta.

Já a cadela 7 (Fig. 7) teve a primeira inseminação no Dia 5 após a onda pré-ovulatória de LH, quando a dosagem de progesterona indicou 25,09 ng/ml (Tab. 3), pois a mesma demonstrou comportamento receptivo tardiamente. Além disso, a citologia vaginal apresentou 80% ou mais de células superficiais apenas quatro dias após o pico de LH, enquanto que as demais cadelas começaram a apresentar citologia vaginal de estro em média no dia do pico de LH (Fig. 6). O comportamento receptivo

tardio da cadela 7 (nulípara) evidenciou a variação que pode ser observada entre as cadelas, com respeito ao comportamento (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Concannon 2004), e está em concordância com o descrito por Johnston et al. (2001), que afirmaram que as cadelas nulíparas e em fase de puberdade podem não apresentar comportamento de estro ou apresentá-lo tardiamente, quando comparadas com cadelas maduras sexualmente.

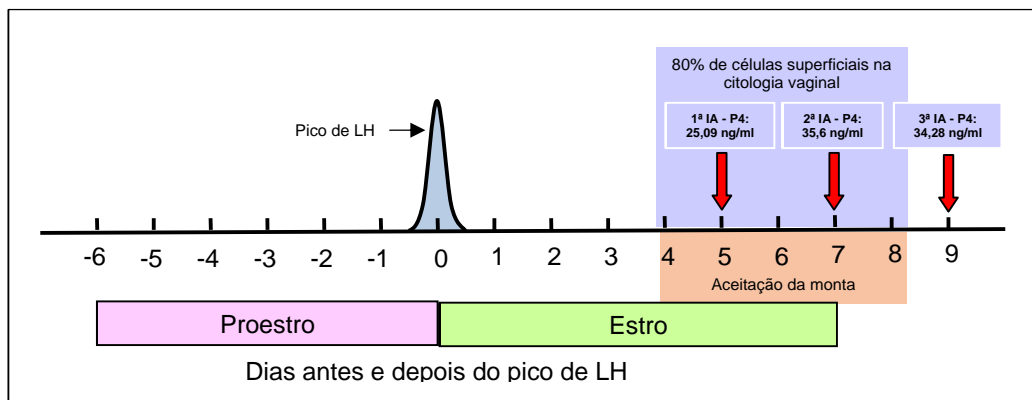


Figura 7: Cronologia das inseminações artificiais da cadela 7 da raça Retriever do Labrador submetida à IA intrauterina transcervical assistida por endoscopia, considerando o período de observação da citologia vaginal com pelo menos 80% de células superficiais, a dosagem de progesterona e o comportamento de aceitação da monta.

A cadela 4 (Fig. 8) também apresentou citologia com características de estro apenas quatro dias depois do pico de LH. No entanto, essa cadela evidenciou tanto comportamento receptivo quanto concentração de progesterona sérica (4,56 ng/ml) indicativos de período ovulatório, um

dia após o pico de LH, sendo que a primeira inseminação artificial foi realizada dois dias após o mesmo (Fig. 8). Essa variação nos parâmetros reprodutivos na fêmea canina foi descrita também por outros autores (Concannon et al., 1989; Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004).

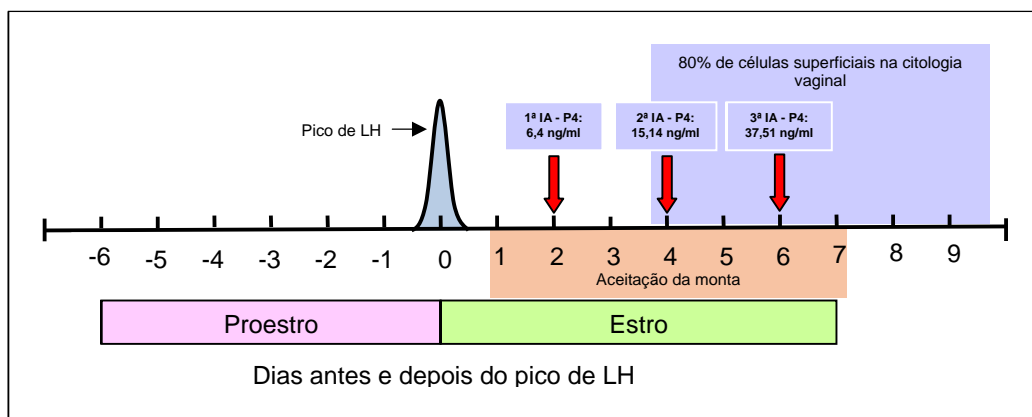


Figura 8: Cronologia das inseminações artificiais da cadela 4 da raça Retriever do Labrador submetida à IA intrauterina transcervical assistida por endoscopia, considerando o período de observação da citologia vaginal com pelo menos 80% de células superficiais, a dosagem de progesterona e o comportamento de aceitação da monta.

Durante os dias de inseminação artificial, a média da concentração de progesterona sérica foi de $9,90 \pm 6,27$ ng/ml na primeira, $19,10 \pm 7,14$ ng/ml na segunda e $32,9 \pm 8,8$ ng/ml na terceira inseminação. Não houve

diferença significativa nas médias da concentração de progesterona entre a primeira e a segunda e entre a segunda e a terceira inseminações (Teste de Kruskal-Wallis) (Tab. 3) No entanto, observou-se

diferença significativa entre as dosagens médias de progesterona entre a primeira e a terceira inseminações (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0001$).

O aumento da concentração de progesterona sérica no decorrer do proestro e do estro variou entre as cadelas (Fig. 9), provavelmente devido a variações individuais quanto à produção de progesterona pelos folículos pré-ovulatórios em processo de luteinização, e ao número de folículos pré-ovulatórios, entre outros fatores (Concannon et al., 1989; Feldman e Nelson, 2004). Desse modo, as

inseminações nas dez cadelas foram realizadas em dias diferentes do ciclo, considerando o primeiro dia de proestro e conforme a evolução do ciclo estral, da seguinte forma: as cadelas 1, 2 e 3 foram inseminadas nos Dias 9, 11 e 13 após o início do proestro. As cadelas 4 e 10 foram inseminadas nos Dias 7, 9 e 11. As fêmeas 5 e 7 foram inseminadas nos Dias 11, 13 e 15; a cadela 6, nos Dias 12, 14 e 16 após o início do proestro. Na fêmea 8, as IA's ocorreram nos Dias 8, 10 e 12; e, na cadela 9, nos Dias 13, 15 e 17 após a detecção do proestro (Fig. 9).

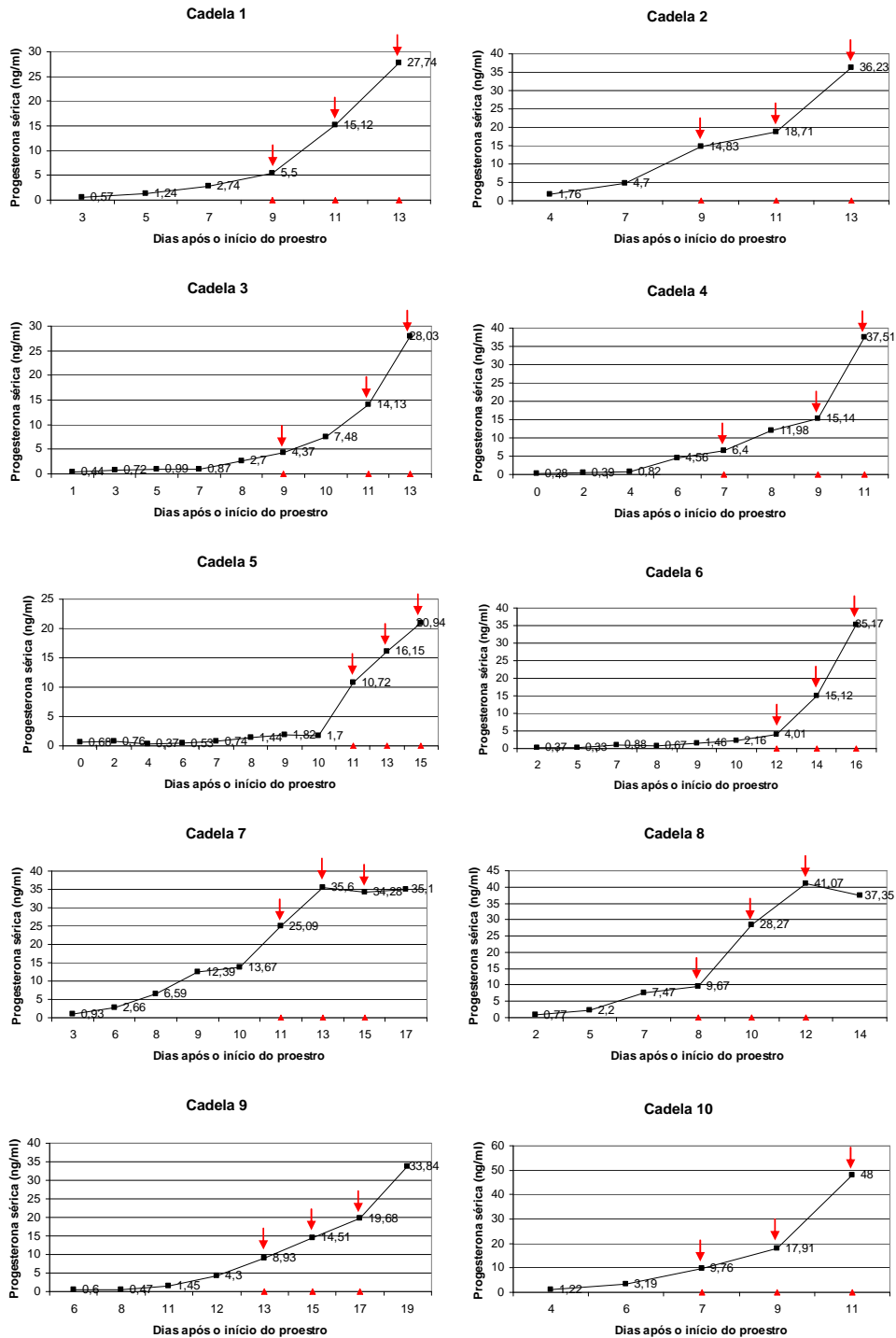


Figura 9: Valores da concentração de progesterona sérica durante o acompanhamento do proestro e nos dias das inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais endoscópicas (setas) das dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

Entre as dez cadelas estudadas e ao longo dos dias de observações e coletas de sangue, observou-se que houve diferença significativa nas concentrações de progesterona na primeira IA (Fig. 10; Tab. 3) (Correlação de Pearson, $r = 0,77$, $p = 0,009$). Do mesmo modo, constatou-se diferença significativa na concentração de progesterona na segunda IA (Fig. 11; Tab. 3) (Correlação de Pearson, $r = 0,80$, $p = 0,006$). No entanto, as concentrações de progesterona dos dias da terceira inseminação foram semelhantes entre as cadelas estudadas (Fig. 12; Tab. 3) (Correlação de Pearson, $r = 0,31$, $p = 0,39$),

demonstrando que a produção de progesterona pelos corpos lúteos atinge um patamar ou aumenta lentamente no final do estro e durante o diestro (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004). Dessa forma, a figura 13 mostra que houve correlação estatisticamente significativa entre os valores de progesterona e a progressão dos dias em que as inseminações foram realizadas, com exceção da terceira inseminação que, mesmo realizada em dias diferentes nas cadelas estudadas, revelou valores estatisticamente semelhantes de progesterona sérica (Fig. 13) (Correlação de Pearson, $r = 0,79$, $p = 0,001$).

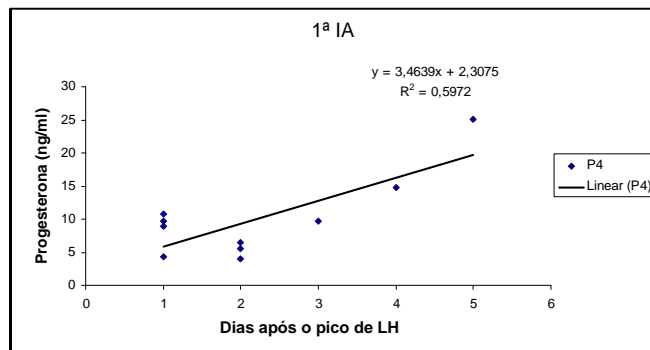


Figura 10: Distribuição da progesterona no dia da primeira inseminação das dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas a inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia com sêmen fresco. (Teste de Correlação de Pearson, $p = 0,05$).

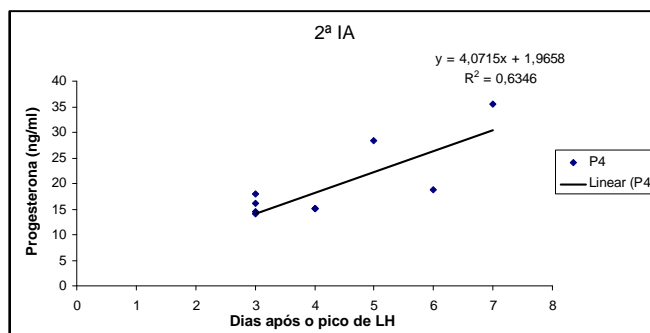


Figura 11: Distribuição da progesterona no dia da segunda inseminação das dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas a inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia com sêmen fresco. (Teste de Correlação de Pearson, $p = 0,05$).

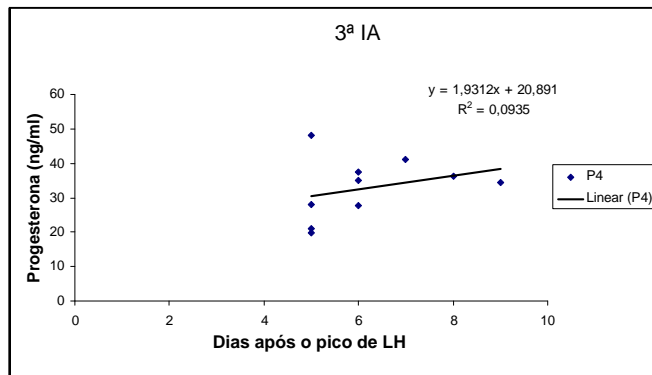


Figura 12: Distribuição da progesterona no dia da terceira inseminação das dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas a inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia com sêmen fresco. (Teste de Correlação de Pearson, $p = 0,05$).

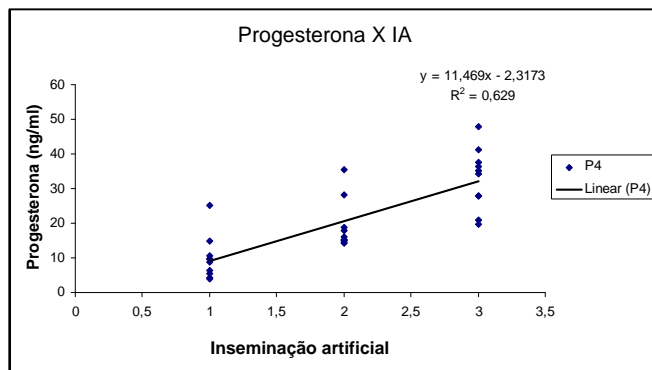


Figura 13: Distribuição da progesterona das três inseminações das dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas a inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia com sêmen fresco. (Teste de Correlação de Pearson, $p = 0,05$).

Os resultados da citologia vaginal coletada durante os dias de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador estão dispostos na Tabela 4. Durante os dias de inseminação artificial, a média de células superficiais na lâmina de citologia vaginal foi de $80 \pm 18,9$ na contagem de 100 células por lâmina, sendo

essa média de $78,9 \pm 24,8$ células superficiais na primeira, $84,3 \pm 7,25$ na segunda e $76,9 \pm 21,2$ na terceira inseminação, indicando que as inseminações foram realizadas na fase de estro (Feldman e Nelson, 2004). Não houve diferença significativa no número de células superficiais entre as três inseminações (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,98$) (Tab. 5).

Tabela 4: Resultados da citologia vaginal (média ± desvio padrão) nos dias de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

Identificação da cadela	1ª IA			2ª IA			3ª IA		
	Células			Células			Células		
	Parab.	Interm.	Superf.	Parab.	Interm.	Superf.	Parab.	Interm.	Superf.
1	0	10	90	0	15	85	0	70	30
2	0	15	85	0	30	70	5	25	70
3	0	7	93	0	5	95	0	6	94
4	0	90	10	0	17	83	0	5	95
5	0	6	94	0	5	95	0	15	85
6	0	20	80	0	20	80	0	10	90
7	0	20	80	0	15	85	0	50	50
8	0	15	85	0	20	80	0	20	80
9	0	20	80	0	15	85	0	10	90
10	0	8	92	0	15	85	0	15	85
Média ± desvio padrão	0	21,1 ± 24,8	78,9 ± 24,8	0	15,7 ± 7,3	84,3 ± 7,3	0,5 ± 1,6	22,6 ± 21,2	76,9 ± 21,3

Tabela 5: Valores médios da citologia vaginal nos dias de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

IA	Células			Total
	Parabasais	Intermediárias	Superficiais	
1	0	21,1 ^a	78,9 ^b	100
2	0	15,7 ^a	84,3 ^b	100
3	5	22,6 ^a	76,9 ^b	100

Teste de Kruskal-Wallis.

^{ab} Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente (p=0,05).

Com base no escore do índice de crenulação anteriormente citado (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Brearley et al., 1991; Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002; Feldman e Nelson, 2004), observou-se uma média de dois, três e quatro na primeira, segunda e terceira inseminações, respectivamente, havendo diferença significativa no índice de crenulação entre a primeira e a terceira inseminações (Teste de Kruskal-Wallis, p = 0,0006) (Tab. 6). As mudanças no aspecto da mucosa vaginal no decorrer do ciclo estral podem ser atribuídas às alterações do epitélio vaginal e na capacidade da mucosa em reter fluido, que são controladas pelo estrógeno (Jeffcoate e Lindsay, 1989). No entanto, não houve correlação significativa

(Correlação de Spearman) entre o índice de crenulação e a concentração de progesterona na primeira (p = 0,52), na segunda (p = 0,58) e na terceira (p = 0,95) inseminações, demonstrando independência entre índice de crenulação e progesterona. Tal resultado corroborou com o relatado na literatura, que afirma que o aumento do índice de crenulação da mucosa vaginal, correspondente ao enrugamento das pregas da mucosa vaginal anteriormente túrgidas, ocorre por influência do declínio da relação estrógeno:progesterona, e não em função exclusivamente da concentração de progesterona (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Feldman e Nelson, 2004).

Tabela 6: Valores médios do índice de crenulação da mucosa vaginal e da progesterona nos dias de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em cadelas da raça Retriever do Labrador (mediana \pm desvio padrão).

IA	Índice de crenulação	Progesterona sérica (ng/ml)	Total
1	2 \pm 0,7 ^a	9,9 \pm 6,26 ^c	10
2	3 \pm 0,6 ^{a,b}	19,1 \pm 7,14 ^{c,d}	10
3	4 \pm 0,9 ^b	32,9 \pm 8,8 ^d	10
Mediana \pm desvio padrão	3 \pm 1	20,6 \pm 12,0	30

Escore do índice de crenulação: (0) pregas aumentadas de volume, arredondadas e róseas; (1) pregas vaginais discretamente murchas, sem angulação, róseas; (2) pregas vaginais discretamente anguladas, pálidas; (3) pregas vaginais enrugadas, com pregas secundárias, pálidas; (4) pregas vaginais engugadas, com angulação acentuada e bordas irregulares, pálidas; (5) mucosa vaginal fina, pregas murchas e arredondadas, rósea. Teste de Kruskal-Wallis.

^{ab} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente ($p = 0,05$).

^{cd} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente ($p = 0,05$).

5.2 Particularidades da técnica de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia

A técnica de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia se mostrou viável para ser utilizada na reprodução de cadelas da raça Retriever do Labrador.

Como uma adaptação da técnica recomendada por Wilson (2003), as cadelas foram colocadas em estação em uma mesa com superfície antiderrapante inclinada em aproximadamente 30°, de modo que o posterior da cadela ficasse mais elevado em relação aos membros anteriores e à cabeça (Fig. 4), com a finalidade de incrementar o transporte do sêmen para as porções mais craniais dos cornos uterinos durante a deposição seminal.

- **Cateter para deposição seminal intra-uterina**

Concannon (2004) relatou o uso de cateteres rígidos, urinários semi-rígidos, angio-

cateteres com balão inflável na extremidade; e Wilson (2003) e Fontbonne (2006) recomendaram o uso de cateteres urinários flexíveis para a inseminação artificial intra-uterina transcervical endoscópica. No entanto, no presente trabalho o uso de cateteres urinários de policloreto de vinila (PVC) dificultou e não permitiu a cateterização do óstio cervical por serem excessivamente flexíveis. Por isso, optou-se pela utilização de cateteres ureterais do tipo “flush”⁴ de neoplex com orifício terminal, que são utilizados em medicina humana para realização de ureteropielografia retrógrada.

O cateter ureteral do tipo “flush”⁴ apresentou as seguintes características:

1. Rigidez e flexibilidade adequadas, que permitiram sua manipulação e direcionamento da sua extremidade concomitante à manipulação do endoscópio para introdução do cateter no óstio cervical e seu avanço pelo canal cervical;
2. O cateter utilizado apresentou comprimento suficiente (74 cm) para a IA transcervical intra-uterina

na cadela, uma vez que essa espécie apresenta vagina com longa extensão;

3. Por outro lado, o cateter, de coloração azul (Fig. 5), impossibilitou a visibilização da passagem do sêmen pelo seu lúmen durante a inseminação;
4. O cateter apresentou graduação externa em centímetros, possibilitando registrar o seu avanço além do óstio cervical e a extremidade do mesmo foi posicionada em 5 cm além do óstio. Essa profundidade foi mantida para que a deposição do sêmen ocorresse no interior do corpo do útero e o volume inseminante pudesse ser impulsionado para ambos os cornos uterinos, além de se tentar evitar o refluxo seminal.

O diâmetro do cateter utilizado (8 fr), recomendado por Wilson (2003), foi adequado para todas as inseminações, com exceção de uma. Na terceira inseminação da cadela 1, não foi possível introduzir o cateter de 8 fr e, então, foi utilizado um cateter de 6 fr. Evidenciou-se dificuldade e resistência na sua passagem pelo óstio e canal cervical, com introdução do cateter até 3 cm de profundidade. Supõe-se que, no momento da terceira inseminação, a cérvix já estava parcialmente fechada, impossibilitando a introdução do cateter de 8 fr, pois, na primeira e na segunda inseminações dessa mesma cadela, esse cateter foi introduzido no canal cervical com facilidade. No dia da terceira IA da cadela 1, citologia vaginal apresentou 70% de células intermediárias e 30% de células superficiais (Tab. 4) e progesterona sérica de 27,74 ng/ml (Tab. 3), indicando que a cadela já estava em diestro e por isso a cérvix poderia estar parcialmente fechada. As demais cadelas desse estudo apresentaram concentrações semelhantes de progesterona no dia da terceira IA (Tab. 3) e, no entanto, não apresentaram dificuldades para a cateterização cervical. Por outro lado,

tais fêmeas ainda apresentavam citologia característica de estro por ocasião da terceira IA.

Nenhuma complicação, como lesões traumáticas na vagina ou na cérvix ou endometrites, foi observada nas cadelas deste estudo após a inseminação intra-uterina transcervical assistida por endoscopia.

- **Dificuldade de cateterização do óstio cervical**

No presente estudo, foi possível cateterizar o óstio cervical em todas as cadelas. Wilson (1993) citou que não foi possível cateterizar todas as cadelas estudadas, particularmente aquelas com a vagina longa e com a cérvix além do alcance do equipamento, ao contrário dos resultados ora apresentados.

A prega mediana dorsal da vagina constituiu um ponto de referência importante para a localização e a identificação do tubérculo cervical. A dificuldade de cateterização do canal cervical, observada em alguns animais, se deu em princípio devido à localização profunda do tubérculo cervical, de modo que o comprimento do endoscópio foi quase que insuficiente para alcançar o óstio cervical. Outro fator que dificultou a introdução do cateter foi a mobilidade acentuada do tubérculo cervical em alguns animais, sendo necessária a manipulação concomitante do endoscópio e do cateter permitindo direcionar o cateter ao óstio, como recomendado por Wilson (2003).

A maior dificuldade de cateterização do óstio cervical ocorreu durante a terceira inseminação da cadela 1, sendo necessários 90 minutos para transposição da cérvix, provavelmente devido ao fechamento parcial do canal cervical, como descrito anteriormente.

Em 20 % (6 de 30) das inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais

assistidas por endoscopia observou-se algum grau de dificuldade de cateterização do óstio cervical, considerando-se o escore anteriormente citado. O grau de dificuldade

na introdução do cateter no óstio cervical foi estatisticamente semelhante entre a primeira, a segunda e a terceira inseminações (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,98$) (Fig. 14).

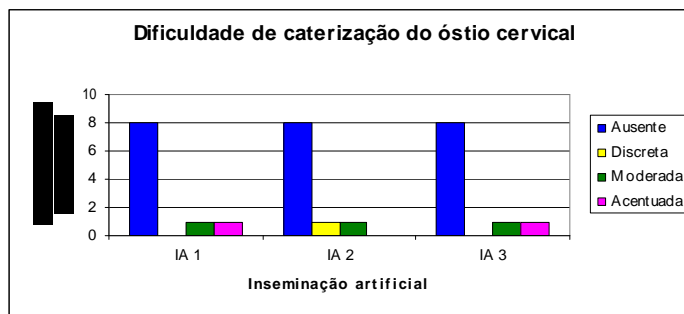


Figura 14: Distribuição da freqüência de observação dos diferentes graus de dificuldade de cateterização do óstio cervical para a realização de inseminação intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

A cateterização do óstio cervical pode ser dificultada pela posição do endoscópio, que deve estar diretamente em frente ao óstio, devendo-se alinhar o tubérculo em frente ao endoscópio, de modo a posicionar o óstio para permitir a introdução do cateter. Deve-se ter em mente que o canal cervical é direcionado crânio-dorsalmente e a angulação da vagina da cadela é variável. Isso pode resultar em ângulos retos entre o óstio cervical e o assoalho vaginal, tornando a cateterização difícil, sendo necessário manipular o endoscópio de modo que a sua extremidade “eleve” o tubérculo vaginal e permita a introdução do cateter (Wilson, 2003).

Em estudo realizado por Wilson (1993) com várias cadelas, o exame endoscópico mostrou variação na posição do óstio cervical no decorrer do estro provavelmente devido à redução do volume das pregas da mucosa vaginal. Essa variação possivelmente determina maior facilidade na cateterização de algumas cadelas. Apesar de não ser estatisticamente significativa, tal variação foi observada no presente estudo, uma vez que as cadelas submetidas a inseminação artificial apresentaram

diferentes imagens vaginoscópicas e graus de dificuldade variados à introdução do cateter no óstio cervical. Algumas cadelas estudadas apresentaram o óstio cervical direcionado ventralmente e, em outras, o óstio estava direcionado ventro-lateralmente, variação esta também apontada por Wilson (2003).

Outro fator que dificultou a cateterização do óstio cervical foi a presença de secreção vaginal sanguinolenta observada na maioria das cadelas, prejudicando a visibilização do óstio cervical. A aspiração da secreção vaginal sanguinolenta foi necessária em 20% (6 de 30) das inseminações artificiais realizadas, apenas quando a presença de secreção impossibilitou a visibilização do óstio cervical, e foi realizada com sucesso através de um cateter uretral de PVC introduzido no outro canal de trabalho da camisa endoscópica. A aspiração da secreção foi recomendada por Wilson (2003).

De acordo com o teste utilizado (Correlação de Spearman), não houve correlação significativa entre a dificuldade de cateterização do óstio cervical e a

concentração de progesterona na primeira ($p = 0,51$), segunda ($p = 0,67$) e na terceira ($p = 0,13$) inseminações artificiais. Isso indica que a evolução do estro e o momento de cateterização do canal cervical em relação ao período fértil (estimado pela dosagem de progesterona) não influenciaram na dificuldade de introdução do cateter no canal cervical, pois são variáveis independentes.

- **Resistência à deposição do sêmen**

Em 30 inseminações intra-uterinas realizadas, observou-se resistência à deposição do sêmen em 23,3 % (7 de 30) dos procedimentos (Tab. 7; Fig. 15). Não houve diferença significativa entre a primeira, a segunda e a terceira inseminações quanto à frequência de observação da resistência durante a introdução de sêmen (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,51$).

Tabela 7: Ocorrência de resistência à deposição do sêmen na primeira, segunda e terceira inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais assistidas por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

IA	Resistência à deposição do sêmen		Total
	Ausente	Presente	
1	9	1	10 ^a
2	8	2	10 ^a
3	6	4	10 ^a
Total	23	7	30

Teste Exato de Fisher.

^a Valores seguidos por letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre as IA's ($p=0,05$).

Na cadela 1, evidenciou-se a acentuada dificuldade de transposição da cérvix na terceira IA e, concomitantemente, houve resistência discreta à introdução do sêmen, de acordo com o escore previamente citado no item 4.4, ao contrário das duas primeiras inseminações que não apresentaram essa dificuldade. A resistência durante a deposição do sêmen foi também observada

na terceira IA da cadela 8, dia em que a progesterona estava em 41,07 ng/ml (Tab. 3), supondo-se estar em diestro. Nas cadelas 7 e 9, foi observada resistência discreta à introdução do sêmen, principalmente no final da deposição, em todos os procedimentos de IA. As cadelas 8, 7 e 9 eram nulíparas, e possivelmente apresentaram menor capacidade de distensão uterina durante a deposição seminal. Segundo Blendinger (2007b), pode haver resistência durante a introdução do sêmen caso a extremidade do cateter esteja em contato com a mucosa endometrial.

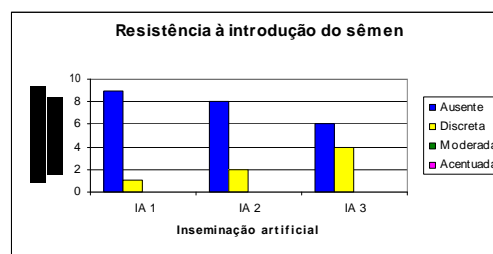


Figura 15: Distribuição da frequência de observação da resistência à introdução do sêmen durante a realização de inseminação intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

- **Refluxo de sêmen**

O refluxo de sêmen observado durante a sua deposição intra-uterina pôde ser visualizado através da imagem no monitor formada pelo conjunto endoscópio-câmera. Foi observada a ocorrência de refluxo de sêmen em 66,7 % (20 de 30) das inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais assistidas por endoscopia realizadas (Tab. 8).

Não foi observada diferença significativa entre as inseminações 1, 2 e 3 quanto à ocorrência de refluxo (Teste Exato de Fisher, $p = 1$) (Tab. 8). Com relação ao volume de sêmen utilizado nas inseminações, foram estabelecidas duas categorias: volumes inseminantes de até 2,4 ml de sêmen e volumes inseminantes entre 2,5 e 3,0 ml (Tab. 9). Do total de 30 IA's,

em dez inseminações em que foram depositados até 2,4 ml de sêmen, observou-se algum grau de refluxo em 60 % dos procedimentos. Enquanto que, de vinte inseminações com volume entre 2,5 e 3,0 ml, 70 % apresentaram refluxo. No entanto, essa diferença entre as categorias de volumes inseminantes não foi estatisticamente significativa (Teste Exato de Fisher, $p = 0,69$) (Tab. 9). Nas cadelas 1, 3, 6 e 10, não foi observado refluxo com a deposição de até 3 ml de sêmen em uma das três inseminações. Por outro lado, na cadela 2, observou-se refluxo mesmo quando o volume inseminante foi de 1 ml (Tab. 10).

Tabela 8: Ocorrência de refluxo de sêmen na primeira, segunda e terceira inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais assistidas por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

IA	Refluxo seminal		Total
	Ausente	Presente	
1	3	7	10 ^a
2	4	6	10 ^a
3	3	7	10 ^a
Total	10	20	30

Teste Exato de Fisher.

^a Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente ($p = 0,05$).

Tabela 10: Volume de sêmen e frequência de refluxo observados na inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

Identificação da cadela	1 ^a IA		2 ^a IA		3 ^a IA	
	Volume de sêmen (ml)	Refluxo (0 ou 1)	Volume de sêmen (ml)	Refluxo (0 ou 1)	Volume de sêmen (ml)	Refluxo (0 ou 1)
1	3	1	3	0	3	1
2	1	1	1	0	3	1
3	3	0	3	1	3	0
4	3	1	3	1	3	1
5	1,2	0	2	1	1,9	1
6	3	1	3	0	2,8	0
7	2	1	1,5	0	3	1
8	3	1	2,2	1	2	0
9	3	1	2,4	1	3	1
10	3	0	3	1	3	1
Média / mediana ± desvio padrão	2,52 ± 0,8 ^a	1 ± 0,9 ^b	2,41 ± 0,7 ^a	1 ± 0,9 ^b	2,77 ± 0,4 ^a	1 ± 0,8 ^b

Escore do refluxo seminal: (0) ausente; (1) presente.

^{ab} Médias seguidas por letras iguais, nas linhas, não diferem estatisticamente ($p = 0,05$).

Tabela 9: Ocorrência de refluxo de sêmen durante 30 inseminações artificiais intra-uterinas transcervicais assistidas por endoscopia com volumes variados de sêmen em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

Volume de sêmen	Refluxo seminal		Total
	Ausente	Presente	
1 a 2,4 ml	4	6	10 ^a
2,5 a 3 ml	6	14	20 ^a
Total	10	20	30

Teste exato de Fisher.

^a Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente ($p = 0,05$).

As cadelas 4 e 9 apresentaram refluxo seminal nas três inseminações, e as demais cadelas apresentaram refluxo em pelo menos uma das inseminações (Tab. 10). Como houve posicionamento do cateter 5 cm além do óstio cervical em todas as cadelas, com exceção da cadela 1, a ocorrência de refluxo pode ser devido a variações individuais na distensão do útero durante da introdução do sêmen no lúmen uterino. No entanto, observou-se nas cadelas 1, 2, 3, 6 e 10 ausência ou presença de refluxo em diferentes inseminações, mesmo quando foi depositado o mesmo volume inseminante (Tab. 10).

O volume inseminante variou de acordo com o volume da segunda fração espermática obtido na coleta de sêmen, sendo que o volume máximo introduzido durante a inseminação foi de 3 ml, na tentativa de evitar o refluxo de sêmen (Wilson, 2003). No presente estudo, mesmo volumes inseminantes menores que dois mililitros de sêmen resultaram em algum grau de refluxo (cadelas 2 e 5) (Tab. 10).

Segundo Wilson (2003), pode ocorrer refluxo de sêmen caso a extremidade do cateter ainda esteja no canal cervical e não no interior do corpo do útero, devendo-se reposicionar o cateter de modo que sua extremidade fique na porção cranial do corpo do útero ou em um dos cornos.

• Tempo de duração do procedimento

A duração total do procedimento, desde a introdução do endoscópio pela vulva até a deposição do sêmen e retirada do endoscópio, foi em média de 14 ± 18 minutos, e variou entre quatro e 100 minutos. Os valores das médias da duração das três inseminações foram $11,5 \pm 4,5$ minutos para a primeira, 10 ± 8 minutos para a segunda e, 19 ± 29 minutos para a terceira (Fig. 16). Apesar de não haver diferença significativa na duração do procedimento entre as três inseminações (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,32$), a variação entre as cadelas ocorreu em decorrência do tempo de introdução do cateter no óstio cervical e o tempo gasto para coleta do sêmen e avaliação espermática imediata. É importante salientar que a coleta do sêmen só foi iniciada após a introdução do cateter no canal cervical para minimizar o tempo de permanência do sêmen fora do trato genital das cadelas. O tempo decorrido durante a coleta do sêmen variou de acordo com o cão doador utilizado, com o condicionamento do reprodutor à coleta,

com a inquietação do animal no ambiente da coleta, entre outros fatores.

O tempo de introdução do cateter (desde o início do procedimento até a cateterização do canal cervical) variou entre 30 segundos e 90 minutos, com média de $6,5 \pm 16,5$ minutos para as três inseminações. A introdução do cateter foi realizada em média $4,2 \pm 3,3$ minutos, $2,9 \pm 4,3$ minutos e $12,4 \pm 28$ minutos após o início do procedimento na primeira, segunda e terceira inseminação artificial, respectivamente (Fig. 16).

Apesar de não haver diferença significativa no tempo de introdução do cateter entre as três inseminações (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,35$), esse tempo variou entre as cadelas em decorrência da dificuldade na introdução do cateter devido a fatores como: profundidade e mobilidade do tubérculo cervical, grau de abertura do canal cervical e presença de secreção vaginal sanguinolenta prejudicando a visibilização do óstio cervical.

A terceira inseminação da cadela 1 apresentou tempo de 90 minutos para a introdução do cateter no óstio cervical, provavelmente devido ao fechamento parcial da cérvix. As demais cadelas apresentaram tempo máximo de 22 minutos para introdução do cateter. Ressalta-se que 66,7% das cateterizações (20 de 30) foram realizadas em até três minutos.

A atitude da cadela durante a inseminação pode influenciar o tempo de execução do procedimento. Comportamentos de inquietação e medo foram observados nas cadelas 6 e 8, respectivamente. A cadela 6 demonstrou inquietação por meio de tentativas de descer da mesa cirúrgica inclinada, influenciando no tempo de cateterização do óstio cervical na primeira inseminação. A cadela 8 demonstrou sinais de medo e permaneceu em decúbito esternal com a cabeça baixa sobre a mesa inclinada

ao invés de manter-se em estação nas três inseminações. No presente estudo, a contenção adequada das cadelas por auxiliares minimizou a influência de comportamentos indesejáveis no tempo de execução dos procedimentos. Segundo Concannon (2004), o tempo necessário para realização da IA intra-uterina varia muito entre as cadelas, podendo ser de cinco a 35 minutos. Entretanto, se a fêmea for inquieta, como observado no presente estudo durante a primeira inseminação da cadela 6, ou se o cateter ou o endoscópio não puder ser manipulado adequadamente, o procedimento pode ser mais demorado.

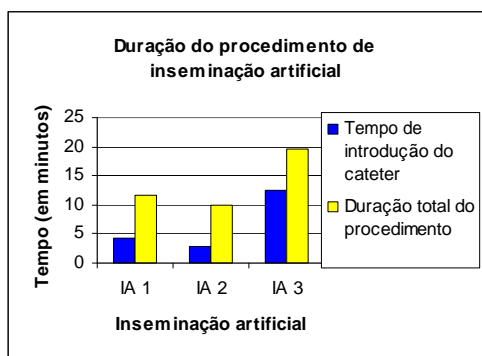


Figura 16: Tempo médio, em minutos, para introdução do cateter no óstio cervical e tempo médio de duração da inseminação intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em dez cadelas da raça Retriever do Labrador.

Todas as dificuldades encontradas durante a execução da técnica de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia foram contornadas e superadas com a manipulação e a utilização otimizada do equipamento e do cateter, devido ao intenso treinamento da equipe.

- **Tempo de elevação do posterior da cadela após a IA**

No presente estudo, o posterior das cadelas foi mantido elevado por 15 minutos após a realização de cada IA, enquanto a região perineal das mesmas era levemente

massageada. Tsumagari et al. (2003) e Blendinger (2007b), recomendam a elevação do posterior por 10 minutos para minimizar o refluxo de sêmen a para facilitar o transporte intra-uterino dos espermatozoides na direção das tubas uterinas (Linde-Forsberg, 2001; Blendinger, 2007b), pois os mesmos são distribuídos pelo trato genital da cadela principalmente devido a contrações vaginais e uterinas (Rijsselaere et al., 2004). Pinto et al. (1998) observaram que a redução no tempo de elevação do posterior da cadela de dez para um minuto após a inseminação artificial intra-vaginal profunda não compromete a fertilidade nem a prolificidade das cadelas. Além disso, Tsutsui et al. (1989) citam que os espermatozoides caninos conseguem atingir o corno uterino um a dois minutos após a deposição vaginal do sêmen. Acredita-se que o leve toque na região perineal da cadela após a inseminação artificial, como foi realizado no presente estudo, estimule as contrações uterinas responsáveis pelo transporte dos espermatozoides para os ovidutos (Linde-Forsberg, 2001).

5.3 Coleta de sêmen e avaliação espermática

O macho utilizado como doador de sêmen para cada cadela foi determinado pelo canil proprietário dos animais. Para tal escolha, foram adotados critérios como características genéticas do cão e qualidade do sêmen. Foram realizadas análises seminais e a utilização do sêmen obedeceu aos critérios de qualidade estabelecidos no item 4.3 deste trabalho. Os resultados médios das avaliações seminais (motilidades total e progressiva, vigor, volume e dose inseminantes) realizadas antes de cada inseminação estão dispostos na Tabela 11. A avaliação da morfologia espermática realizada após as inseminações demonstrou que todos os ejaculados

utilizados apresentaram menos de 25% de anormalidades espermáticas totais

Os ejaculados que foram utilizados em cada inseminação apresentaram em média $467 \pm 313,06 \times 10^6$ espermatozoides móveis por dose (variando entre $38,5$ e $1217,7 \times 10^6$) e o volume do sêmen introduzido foi em média $2,57 \text{ ml} \pm 0,67 \text{ ml}$ (variando entre $1,2$ e $3,0 \text{ ml}$). As doses inseminantes utilizadas

nas três inseminações foram estatisticamente semelhantes (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,9$).

Não houve correlação significativa entre a dose inseminante, dada pelo número de espermatozoides móveis na dose, e o tamanho da ninhada (Correlação de Pearson, $r = 0,03$, $p = 0,93$).

Tabela 11: Valores médios (média \pm desvio padrão) das motilidades total e progressiva, vigor espermático, volume e dose do sêmen utilizado na inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia.

IA	Características seminais				
	Motilidade total (%)	Motilidade progressiva (%)	Vigor (1 – 5)	Volume inseminante (ml)	Dose inseminante ($\times 10^6$ sptz móveis)
1	$90 \pm 7,4^a$	$85 \pm 7,8^a$	$4,6 \pm 0,7^a$	$2,52 \pm 0,8^a$	$468,21 \pm 373,8^a$
2	$85,5 \pm 7,9^a$	$81,5 \pm 8,5^a$	$4,35 \pm 0,6^a$	$2,41 \pm 0,7^a$	$418,29 \pm 257,1^a$
3	$87 \pm 7,5^a$	$82 \pm 7,5^a$	$4,38 \pm 0,6^a$	$2,77 \pm 0,4^a$	$509,5 \pm 326,6^a$
Total	$87,5 \pm 7,6$	$82,8 \pm 7,8$	$4,4 \pm 0,6$	$2,57 \pm 0,67$	$466,9 \pm 313,1$

Teste de Kruskal-Wallis.

^a Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente ($p = 0,05$).

O repouso sexual prolongado pode levar à observação de amostras com menor concentração espermática e maior porcentagem de espermatozoides morfologicamente anormais, devido à presença de espermatozoides em degeneração nos epidídimos (Kustritz, 2007). O repouso sexual foi observado em particular no histórico do macho doador de sêmen E, e as concentrações espermáticas dos ejaculados deste cão foram $43,89 \times 10^6$, $112,5 \times 10^6$ e $259,7 \times 10^6$ espermatozoides móveis por dose inseminante nos três dias de inseminação da cadela 6. Observou-se que a concentração espermática aumentou com as coletas realizadas a cada 48 horas. Os cães com baixa porcentagem de espermatozoides normais podem ser usados para reprodução contanto que tenham maior número total de espermatozoides no ejaculado, de modo que a dose inseminante de espermatozoides morfologicamente normais seja aceitável (Jeffcoate e Lindsay, 1989; Kustritz, 2007). Além disso, para esses cães com baixa qualidade seminal, a realização da

inseminação intra-uterina aumenta as chances de obtenção de resultados satisfatórios de fertilidade (Johnston et al., 2001; Linde-Forsberg; 2001; Wilson, 2003).

Foram observadas células de defesa em quantidade moderada na amostra de sêmen utilizada na primeira inseminação da cadela 8, do cão doador C, suspeitando-se de balanopostite discreta, uma vez que a presença de células inflamatórias de defesa geralmente é indicativa de contaminação prepucial (Vannucchi et al., 1998; Johnson, 2006). Previamente às duas coletas de sêmen para a segunda e a terceira IA's, foi realizado lavado prepucial com solução de Cloreto de Sódio a 0,9% estéril e secagem com compressa estéril, não sendo observadas mais células inflamatórias.

5.4 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado por meio da ultra-sonografia abdominal entre os

dias 26 e 51 após o pico de LH. O diagnóstico de gestação por esse método foi eficaz para detectar a prenhez em momentos variados da gestação em todas as cadelas estudadas. Na cadela 4, submetida à ultra-sonografia abdominal no 30º dia após o pico de LH que, de acordo com a literatura consultada, seria o momento ideal para realização da ultra-sonografia diagnóstica (Concannon e Verstegen, 2004; Concannon, 2005; Johnson, 2008), não foi observada a presença de estruturas fetais ou placentárias.

Durante a ultra-sonografia para diagnóstico gestacional, foi observada reabsorção de duas vesículas embrionárias (uma em cada corno uterino) nas cadelas 1 e 10, no 37º e 39º dias após o pico de LH, respectivamente. A morte fetal precoce resultando em reabsorção ou aborto de toda a ninhada ou de um ou dois fetos é, provavelmente, mais freqüente na espécie canina do que geralmente é diagnosticado (Jeffcoate e Lindsay, 1989). Fetos inviáveis não apresentam movimentos cardíacos nem definição morfológica. Após a morte, o tamanho do feto reduz e assume a aparência de uma massa ovóide de ecogenicidade heterogênea à ultra-sonografia abdominal (Freitas e Silva, 2008; Johnson, 2008).

A perda de um ou mais conceptos pode ser um fenômeno fisiológico em ninhadas grandes (England e Russo, 2006). Segundo a literatura consultada, avaliações ultra-sonográficas múltiplas revelaram a ocorrência de perdas espontâneas de embriões e fetos que não seriam detectadas, incluindo a reabsorção de todos os embriões ou alguns deles apenas entre os dias 28 e 36 após o pico de LH. Estudos ultra-sonográficos indicaram que a reabsorção de um ou mais embriões ocorreu em dez a 15% das gestações e a reabsorção total ocorreu em cinco a dez por cento das gestações avaliadas (Johnston et al., 2001; Concannon e Verstegen, 2004; Concannon, 2005), com a continuação da gestação a termo (England e Russo, 2006).

A reabsorção é precedida por um atraso no desenvolvimento embriológico inicial em relação ao tempo estimado de gestação (Concannon, 2005), e tem como características a ausência de batimentos cardíacos, tamanho reduzido dos embriões em reabsorção, separação da placenta da parede uterina, ecogenicidade aumentada e perda do líquido alantoideano, perda da definição das bordas do feto, e a perda de todo o conteúdo do embrião, incluindo os fluidos (England e Russo, 2006; Johnson, 2008). Os abortos observados após o Dia 40 são menos freqüentes e representam maior probabilidade de doença ou infecção (Concannon, 2005). Após a reabsorção, o útero apresenta aspecto relativamente homogêneo e moderadamente hipoecóico no local da reabsorção (England e Russo, 2006).

5.5 Duração da gestação

O parto das cadelas do presente estudo ocorreu em média $65,8 \pm 1,1$ dias após a data do pico de LH, que coincide a literatura que cita que a duração da gestação em cadelas de raças variadas é de 64 a 66 dias após o pico de LH (Johnston et al., 2001; Kutzler et al., 2003a; Kutzler et al., 2003b; Concannon, 2005; Eilts et al., 2005; Kim et al., 2007; Johnson, 2008; Lopate, 2008). No entanto, os resultados do presente estudo apresentaram-se diferentes daqueles apresentados por Eilts et al. (2005), que avaliaram a duração da gestação de 215 cadelas da raça Retriever do Labrador, e observaram a média de gestação nessa raça de $62,9 \pm 1,3$ dias. Esses últimos observaram ainda que a duração da gestação nessa raça não foi influenciada pela idade ou parto prévio das cadelas, não havendo diferença entre pluríparas e nulíparas.

As cadelas com um ou dois filhotes tendem a apresentar tempo de gestação mais longo que aquelas com maior número de fetos (Eilts et al., 2005; Thomassen et al., 2006;

Tsutsui et al., 2006). A cadela 10 apresentou apenas um feto à ultra-sonografia realizada no 38º dia após o pico de LH e o parto ocorreu no 68º dia após o pico de LH. Houve distocia devido à presença de feto único maior do que o normal para a raça, e procedeu-se a realização de manobras obstétricas com tração do feto natimorto. A literatura relata que filhotes maiores que o normal em gestação com feto único aumenta as chances de distocia (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004; Johnson, 2008).

A cadela 6, com sete fetos viáveis à ultra-sonografia, apresentou, a partir do 63º dia de gestação, acentuado edema vulvar e perineal, com exposição parcial da mucosa vestibular e estrangúria. Foi aplicado dexametasona, para estimular a maturação pulmonar fetal, na dose de 2 mg/kg, pela via intravenosa, 12 horas antes da cesariana, que foi realizada no Dia 65 após o pico de LH. A ultra-sonografia abdominal realizada imediatamente antes da cesariana revelou frequência cardíaca fetal média de 170 bpm, confirmou viabilidade fetal e presença de motilidade intestinal, indicativa de parto a termo. Houve, então, o nascimento de sete filhotes ativos e maduros, e o edema vulvar e perineal da cadela reduziu espontaneamente em cinco dias.

Essa cadela apresentou histórico de edema vulvar e relaxamento perineal após o parto anterior, com impossibilidade de micção voluntária, sendo necessária a cateterização vesical para remoção da urina. O edema naquela ocasião foi auto-limitante, com regressão em dez dias. Gouletsou et al. (2008) relataram a ocorrência dessa alteração acrescida de prolapso de prega vaginal em uma cadela durante o terço final da gestação, 13 dias antes do parto, e alegou que o relaxamento excessivo dos tecidos pélvicos pré-parto associado à pressão intra-abdominal aumentada podem ser responsáveis pela ocorrência do prolapso das pregas vaginais pré-parto.

A indicação da operação cesariana programada na espécie canina inclui os seguintes critérios: cadela nulípara com mais de seis anos de idade, ninhada com dois ou menos filhotes, ninhada com oito filhotes ou mais, raça braquicefálica, cadela com histórico prévio de distocia, cadela com acesso limitado a atendimento veterinário, ou cadela com histórico familiar de distocia (Smith, 2007; Kim et al., 2007; Traas, 2008).

A combinação do diagnóstico rápido de distocia e da intervenção cirúrgica imediata propicia o melhor resultado para a cadela e filhotes. A cesariana pode ser realizada com segurança a partir de 63 dias após pico de LH (Smith, 2007), sendo que a evidência de movimentos intestinais sugerem fetos a termo (Concannon, 2005). A dexametasona é administrada na cadela para estimular a produção de surfactante pulmonar nos fetos (Smith, 2007), e deve ser administrada de oito a 24 horas antes da cesariana eletiva (Concannon e Verstegen, 2004; Concannon, 2005). Na avaliação ultra-sonográfica, a frequência cardíaca fetal normal durante o parto é de 170 a 230 bpm. Os fetos normais são ativos quando estão a termo. Os movimentos fetais e a frequência cardíaca ficam reduzidas em decorrência de estresse fetal e hipoxemia (Johnston et al., 2001; Johnson, 2008; Lopate, 2008; Traas, 2008). O estresse fetal pode ser considerado grave quando a frequência cardíaca for menor que 180 batimentos por minuto entre os dias 58 e 62 de gestação (England et al., 2003).

6. CONCLUSÕES

- A técnica de inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia se mostrou viável para cadelas da raça Retriever do Labrador.
- As particularidades da técnica de inseminação artificial intra-uterina

transcervical assistida por endoscopia, como dificuldade de cateterização do óstio cervical, resistência à deposição intra-uterina do sêmen e refluxo seminal, foram semelhantes entre a primeira, a segunda e a terceira inseminações nas cadelas estudadas.

- O cisto-uretroscópio rígido (30 cm, 4 mm de diâmetro e 30°) e a camisa endoscópica (22 fr) foram adequados para a realização da inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em cadelas da raça Retriever do Labrador.
- O cateter ureteral do tipo “flush” com orifício terminal foi adequado para a cateterização do óstio cervical e deposição intra-uterina do sêmen durante a inseminação transcervical assistida por endoscopia em cadelas da raça Retriever do Labrador.
- A taxa de prenhez e tamanho da ninhada foram satisfatórios em relação à raça Retriever do Labrador após a realização da inseminação artificial intra-uterina transcervical endoscópica utilizando sêmen canino fresco em três inseminações (com intervalo de 48 horas) por estro.
- Os métodos utilizados para avaliar os parâmetros comportamentais e reprodutivos durante o ciclo estral das cadelas foram eficazes para a determinação do período de realização da inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia.
- As dosagens seriadas de progesterona sérica permitiram determinar o dia de ocorrência do

pico de LH e, conseqüentemente, da ovulação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BLENDINGER, K. Physiology and pathology of the estrous cycle of the bitch. In.: 56th CONGRESSO INTERNAZIONALE MULTISALA SCIVAC, 2007a, Rimini. *Proceedings of the 56th SCIVAC Congress*, p. 73-77.

BLENDINGER, K. Techniques of artificial insemination by fresh, chilled and frozen semen. In.: 56th CONGRESSO INTERNAZIONALE MULTISALA SCIVAC, 2007b, Rimini. *Proceedings of the 56th SCIVAC Congress*, p. 87-89.

BREARLEY, M.J.; COOPER, J.E.; SULLIVAN, A. *A colour atlas of small animal endoscopy*. Aylesbury: Wolfe Publishing Ltd., 1991. 128 p.

BUTINAR, J.; MUJAGIC, E; GALAC, S. The oestrus cycle in the bitch: a review article. *Slov. Vet. Res.*, v. 41, n.1, p. 5-11, 2004.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Determinação da concentração espermática no sêmen de cães Pastores Alemães através da espectrofotometria. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 27, n. 3, p. 384-386, 2003.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 29, n. 3/4, p. 179-187, 2005.

CHAPWANYA, A.; CLEGG, T.; STANLEY, P.; et al. Comparison on the Immulite and RIA assay methods for

measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. *Theriogenology*, v. 70, p. 795-799, 2008.

CHATDARONG, K.; AXNÉR, E.; MANEE-IN, S.; et al. Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen. *Theriogenology*. v. 68, p. 1326-1333, 2007.

CONCANNON, P.W. Canine breeding management and artificial insemination: techniques and caveats. In.: 29th WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 2004, Rhodes. *Proceedings ...* (online). Disponível em: <www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2004&0+Generic>. Acesso em: 14/12/08.

CONCANNON, P.W. Canine physiology of reproduction. In: BURKE, T.J. *Small animal reproduction and infertility*. A clinical approach to diagnosis and treatment. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 23 – 77.

CONCANNON, P.W.; McCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 39, p.3-25, 1989.

CONCANNON, P.W. Understanding and monitoring canine pregnancy. In.: 30th WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 2005, Mexico City. *Proceedings...* (online). Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2005/97.pdf>>. Acesso em: 15/01/2009.

CONCANNON, P.W.; VERSTEGEN, J. Pregnancy management in dogs and cats. In.: 29th WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 2004, Rhodes. *Proceedings ...* (online). Disponível

em: <www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2004&0+Generic>. Acesso em: 14/12/08.

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

EILTS, B.E.; DAVIDSON, A.P.; HOSGOOD, G.; et al. Factors affecting gestation duration in the bitch. *Theriogenology*, v. 64, p. 242-251, 2005.

ENGLAND, G.; CONCANNON, P.W. Determination of the optimal breeding time in the bitch: Basic considerations. In: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J.; et al. *Recent advances in small animal reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2002. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Concannon/england2/chapter_frm.asp?LA=1>. Acesso em: 02/05/2006.

ENGLAND, G.C.W.; RUSSO, M. Ultrasonographic characteristics of early pregnancy failure in bitches. *Theriogenology*, v. 66, p.1694-1698, 2006.

ENGLAND, G.C.; YEAGER, A.E. Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 47, p.107-117, 1993.

ENGLAND, G.C.; YEAGER, A.E.; CONCANNON, P.W. Ultrasound imaging of the reproductive tract in the bitch. In.: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J.; et al. *Recent advances in small animal reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2003. Disponível em: <<http://www.ivis.org/advances/Concannon/e>

- ngland/chapter.asp?LA=1>. Acesso em: 13/01/2009.
- FARACO, C.B.; SEMINOTTI, N. A relação homem - animal e a prática veterinária. *Revista CFMV*, v. 10, n. 32, p. 57-62, 2004.
- FARSTAD, W.; ANDERSEN-BERG, K. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J. Reprod. Fert.*, 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*. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2004. 1089 p.
- FERGUSON, J. M.; RENTON, J. P.; FARSTAD, W.; et al. Insemination of beagle bitches with frozen semen. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 39, p.293-298, 1989.
- FONTBONNE, A; BADINAND, F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 47, p.325-327, 1993.
- FONTBONNE, A.; MALANDAIN, E. Ovarian ultrasonography and follow-up of estrus in the bitch and queen. *Waltham Focus*, v. 16, n. 2, p. 22-29, 2006.
- FONTBONNE, A. How to perform transcervical catheterization in the bitch. In.: 31st WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 2006, Sidney. *Proceedings ...*, p. 721-722. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture24/Fontbonne3.pdf?LA=1>>. Acesso em: 15/01/2009.
- FREITAS, J.G.; SILVA, A.R. Diagnóstico de gestação em cadelas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 32, n. 1, p. 58-66, 2008.
- FUKUSHIMA, F.B. *Inseminação intra-uterina por videolaparoscopia com sêmen congelado na cadela: comparação entre dois sítios de deposição*. 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GABALDI, S.H. ; LOPES, M.D. Considerações sobre a congelação de sêmen canino. *Clínica Veterinária*, n. 14, p. 24-26, 1998.
- GOODMAN, M. Desmystifying ovulation timing. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 17, n. 3, p. 97 – 103, 2002.
- GOULETSOU, P.G.; GALATOS, A.D.; APOSTOLIDIS, K.; et al. Vaginal fold prolapse during the last third of pregnancy, followed by normal parturition, in a bitch. *Anim. Reprod. Sci.* In press: disponível online em outubro/2008. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.032.
- HAYER, P.; GÜNZEL-APEL, A.R.; LÜERSSEN, D.; et al. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 47, p.93-100, 1993.
- HASE, M.; HORI, T.; KAWAKAMI, E.; et al. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 62, n. 3, p. 243-248, 2000.
- JEFFCOATE, I.A; LINDSAY, F.E.F. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in

- domestic bitches. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 39, p.277-287, 1989.
- JOHNSON, C. Current concepts on infertility in the dog. *Waltham Focus*, v. 16, n. 2, p. 7-12, 2006.
- JOHNSON, C.A. Pregnancy management in the bitch. *Theriogenology*, v. 70, p. 1412-1417, 2008.
- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Breeding management and artificial insemination of the bitch. In: JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. Cap.4, p.41-65.
- KIM, Y.; TRAVIS, A.J.; MEYERS-WALLEN, V.N. Parturition prediction and timing of canine pregnancy. *Theriogenology*, v. 68, p. 1177-1182, 2007.
- KUSTRITZ, R. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*, v. 68, p. 329-337, 2007.
- KUSTRITZ, R. Use of commercial luteinizing hormone and progesterone assay kits in canine breeding management. In: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J. *Recent advances in small animal reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Concannon/root2/chapter_frm.asp?LA=1>. Acesso em: 15/01/2009.
- KUTZLER, M.A.; MOHAMMED, H.O.; LAMB, S.V.; et al. Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology*, v. 60, p. 1187-1196, 2003a.
- KUTZLER, M.A.; YEAGER, A.E.; MOHAMMED, H.O.; et al. Accuracy of canine parturition date prediction using fetal measurements obtained by ultrasonography. *Theriogenology*, v. 60, p. 1309-1317, 2003b.
- LÉVY, X.; FONTBONNE, A. Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 31, n. 1, p. 128-134, 2007.
- LINDE, C.; KARLSSON, I. The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *J. Small Anim. Pract.*, v. 25, p. 77-82, 1984.
- 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: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J. *Recent advances in small animal reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: <<http://www.ivis.org/advances/Concannon/linde/chapter.asp?LA=1>>. Acesso em: 12/01/2009.
- LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 39, p.299-310, 1989.
- 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, p.11-23, 1999.
- LINDSAY, F.E.B.; CONCANNON, P.W. Normal canine vaginoscopy. In: BURKE, T.J. *Small animal reproduction and infertility*. A clinical approach to diagnosis

and treatment. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 112 – 120.

LOPATE, C. Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: a review. *Theriogenology*, v. 70, p. 397-402, 2008.

LUZ, M.R.; FREITAS, P.M.C.; PEREIRA, E.Z. Gestação e parto em cadelas: fisiologia, diagnóstico de gestação e tratamento das distocias. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 29, n. 3/4, p. 142-150, 2005.

MALM, C.; ROCHA, P.R.S.; GHELLER, V.A.; VALLE, G.R.; LAMOUNIER, A.R.; MARTINS, C. Inseminação intra-uterina pela técnica videolaparoscópica na cadela. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 2000, Goiânia. *Anais ...*, 2000, p.162-162.

MARINELLI, L.; ROTA, A.; CARNIER, P.; et al. Factors affecting progesterone production in *corpora lutea* from pregnant and diestrous bitches. *Anim. Reprod. Sci.* In press: disponível online em outubro/ 2008. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.10.001.

MARSELOO, N.; FONTBONNE, A.; BASSU, G.; et al. Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in the bitch. In.: 5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 2004, São Paulo. *Proceedings ...* São Paulo, SP: ISCFR, 2004.

MARTÍNEZ, A.I.P. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82-83, p. 209-224, 2004.

MEYERS-WALLEN, V.N. Unusual and abnormal canine estrous cycles. *Theriogenology*, v. 68, p. 1205-1210, 2007.

OLIVEIRA, E.C.S.; MARQUES JÚNIOR, A.P.; NEVES, M.M. Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela – revisão. *Archives of Veterinary Science*, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2003.

PHEMISTER, R.D.; HOLST, P.A.; SPANO, J.S.; et al. Time of ovulation in the Beagle bitch. *Biol. Reprod.*, v. 8, p. 74-82, 1973.

PINTO, C.R.F.; EILTS, B.E.; PACCAMONTI, D.L. The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. *Theriogenology*, v. 50, p. 301-305, 1998.

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, p. 1029-1036, 2006.

REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; et al. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. *Theriogenology*, v. 66, p. 1685-1693, 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 Research*. v. 128, p. 801-811, 2004.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Endocrinologia reprodutiva na cadela. *Clínica Veterinária*, n. 40, p. 50-58, 2002.

SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SANTOS, S.E.C.; VANNUCCHI, C.I. Inseminação artificial em cães. *Clínica Veterinária*, v. 2, n. 6, p. 22-24, 1997.

- SEAGAR, S.W.J. Artificial insemination in dogs. In: BURKE, T.J. *Small animal reproduction and infertility*. A clinical approach to diagnosis and treatment. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 207 – 217.
- SHIMATSU, Y.; KATAGIRI, K.; ARAKAWA, H.; et al. Fertilities from mating and artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa by indexing LH surge in Beagle bitches. *Journal of Reproduction and Development*. v. 46, n. 5, p. 315 – 318, 2000.
- SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B., et al. Comparisons of intravaginal and intra-uterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet. Rec.*, 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, p.615-623, 1995.
- 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 (RPCV)*, n. 98, p.53-60, 2003.
- SMITH, F.O. Challenges in small animal parturition – Timing elective and emergency cesarian sections. *Theriogenology*, v. 68, p. 348-353, 2007.
- SON, C.; JEONG, K.; KIM, J.; et al. Establishment of the prediction table of parturition day with ultrasonography in small pet dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 63, n. 7, p. 715-721, 2001.
- STONE, E. A.; CANTRELL, C. G.; SHARP, N. J. H. Ovário e útero. In: SLATTER, D. *Manual de cirurgia de pequenos animais*. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. p. 1540-1558.
- THOMASSEN, R.; SANSON, G. KROGENAES, A.; et al. Artificial insemination with frozen semen in dogs : A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology*, v.66, p.1645-1650, 2006.
- THURÓCZY, J.; WÖFLING, A.; TIBOLD, A.; et al. Effect of anticoagulants and sampling time on results of progesterone determination in canine blood samples. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 38, p. 386-389, 2003.
- TRAAS, A.M. Surgical management of canine and feline dystocia. *Theriogenology*, v. 70, p. 337-342, 2008.
- 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. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 65, n. 9, p. 1003-1005, 2003.
- TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 39, p.269-275, 1989.
- TSUTSUI, T.; KAWAKAMI, E. MURAO.; et al. Transport of spermatozoa in the reproductive tract in the bitch: observations through uterine fistula. *Japanese Journal of Veterinary Science*, v. 51, p. 560-565, 1989.
- TSUTSUI, T.; HORI, T.; KIRIHARA, N.; et al. Relation between mating or ovulation and the duration of gestation in dogs. *Theriogenology*, v. 66, p. 1706-1708, 2006.
- VANNUCCHI, C.I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S.E.C. Avaliação seminal em cães: aspectos práticos. *Clínica Veterinária*, n. 15, p. 22-26, 1998.

VOLKMANN, D.H. The effects of storage time and temperature and anticoagulant on laboratory measurements of canine blood progesterone concentrations. *Theriogenology*, v. 66, p. 1583-1586, 2006.

WILDT, D.E.; CHAKRABORTY, P.K.; PANKO W.B.; et al. Relationship of reproductive behaviour, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biol. Reprod.*, v. 18, p. 561-570, 1978.

WILSON, M.S., Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J. Reprod. Fert.*, 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: <<http://www.ivis.org/advances/Concannon/wilson/chapter.asp?LA=1>>. Acesso em: 15/01/2009.

WRIGHT, P.J. Application of vaginal cytology and plasma progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. *Journal of Small Animal Practice*, v. 31, p. 335-340, 1990.

8. 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 204/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em cadelas da raça Retriever do Labrador**", 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 **4/ 04/2007**.

Este certificado expira-se em **4/ 04 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 204/2006**, related to the project entitled "**Endoscopic transcervical intrauterine artificial insemination in Labrador Retriever bitches**", 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 **April 4, 2007**.

This certificate expires in **April 4, 2012**.

Belo Horizonte, 30 de Junho de 2009.

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/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO 2: Valores da progesterona sérica durante as fases de proestro e estro em dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas a inseminação artificial intra-uterina transcervical endoscópica.

Identificação da cadela	Dias após o início do proestro	Dosagem de progesterona (ng/ml)
1	3	0,57
1	5	1,24
1	7	2,74
1	9	5,50 *
1	11	15,12 **
1	13	27,74 ***
2	4	1,76
2	7	4,7
2	9	14,83 *
2	11	18,71 **
2	13	36,23 ***
3	1	0,44
3	3	0,72
3	5	0,99
3	7	0,87
3	8	2,7
3	9	4,37 *
3	10	7,48
3	11	14,13 **
3	13	28,03 ***
4	0	0,28
4	2	0,39
4	4	0,82
4	6	4,56
4	7	6,4 *
4	8	11,98
4	9	15,14 **
4	11	37,51 ***
5	0	0,68
5	2	0,76
5	4	0,37
5	6	0,53
5	7	0,74
5	8	1,44
5	9	1,82
5	10	1,7
5	11	10,72 *
5	13	16,15 **
5	15	20,94 ***
6	2	0,37
6	5	0,33
6	7	0,88
6	8	0,67
6	9	1,46
6	10	2,16
6	12	4,01 *
6	14	15,12 **
6	16	35,17 ***

* Data da primeira IA; ** Data da segunda IA; *** Data da terceira IA.

ANEXO 2 (Cont.): Valores da dosagem de progesterona sérica durante o acompanhamento das fases de proestro e estro em dez cadelas da raça Retriever do Labrador submetidas a inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia.

Identificação da cadela	Dias após o início do proestro	Dosagem de progesterona (ng/ml)
7	3	0,93
7	6	2,66
7	8	6,59
7	9	12,39
7	10	13,67
7	11	25,09 *
7	15	34,28 ***
7	17	35,1
8	2	0,77
8	5	2,2
8	7	7,47
8	8	9,67 *
8	10	28,27 **
8	12	41,07 ***
8	14	37,35
9	3	0,21
9	6	0,6
9	8	0,47
9	11	1,45
9	12	4,3
9	13	8,93 *
9	15	14,51 **
9	17	19,68 ***
9	19	33,84
10	4	1,22
10	6	3,19
10	7	9,76 *
10	9	17,91 **
10	11	48 ***

* Data da primeira IA; ** Data da segunda IA; *** Data da terceira IA.

ANEXO 4: Quadro de avaliação da inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

ID cadela:	Idade:	Peso:
Data:	Progesterona: ng/ml	
Duração do procedimento:	Início:	Término:
	Introdução do cateter:	
Equipe:		
Índice de crenulação: () 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5		
Dose inseminante (ml): + 1,2 ml de ar		
Observações & Complicações:		
Aspecto da mucosa vaginal: Normal		
Introdução do cateter: cm (Máx.: cm)		
Dificuldade de transposição da cérvix: () Sim () Não		
Resistência à introdução do sêmen: () Sim () Não		
Refluxo: () Sim, acentuado () Não		
Observações:		

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.