

Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina

Main aspects for the accomplishment of artificial insemination in canine species

Alexandre R. Silva*, Rita de Cássia S. Cardoso, Lúcia D. M. Silva

Laboratório de Reprodução de Carnívoros / PPGCV / UECE, Av. Paranjana, 1700, Itaperi, 60740-000, Fortaleza - Ceará, Brasil

Resumo: A inseminação artificial pode ser utilizada como um meio alternativo na impossibilidade de realização de monta natural ou na utilização de sémen refrigerado ou congelado. Assim, o presente trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão geral acerca dos principais aspectos ligados à aplicação dessa biotécnica na espécie canina. Dentre esses aspectos, pode-se destacar a utilização de sémen fresco, refrigerado e congelado; os diversos métodos descritos para o monitoramento do ciclo éstrico, como a citologia vaginal, vaginoscopia, dosagens hormonais, ultrassonografia e mensuração de resistência elétrica do muco cervical; bem como as vias de inseminação intravaginal e intrauterina. Finalmente, são traçadas considerações sobre a eficiência da inseminação artificial nessa espécie de fisiologia tão particular.

Summary: The artificial insemination can be used as an alternative way when the natural mating cannot be performed or when chilled or frozen semen is used. Thus, the aim of this study is to present a general review about the main aspects for the accomplishment of this biotechnique in canine species. Concerning those aspects, it can stand out the use of fresh, chilled and frozen semen; the several methods described for the estral cycle monitoring, as the vaginal cytology, vaginoscopy, hormone assay, ultrasound and electric resistance measurement of the cervical mucus; as well as the routes of insemination intravaginal and intrauterine. Finally, considerations are made on the efficiency of the artificial insemination in that species of such a peculiar physiology.

Introdução

A inseminação artificial (IA) consiste em, após a obtenção do sémen, depositá-lo no trato genital da fêmea a ser inseminada. Essa técnica pode ser utilizada como um meio alternativo quando da impossibilidade de realização de monta natural, devido a problemas anatômicos, comportamentais e sanitários, ou ainda, quando da utilização de sémen refrigerado ou congelado. Sendo de principal relevância este último, que possibilita a manutenção da capacidade fecundante em animais de alto interesse zootécnico por um espaço indeterminado de tempo, além de resguardar tais ani-

mais do estresse causado pelo seu transporte para fins de acasalamento (Guérin, 1998).

A primeira IA notificada cientificamente foi realizada no final do século XVIII por Spallazani, que utilizou sémen fresco obtido da vagina de uma cadela naturalmente acasalada e depositou-o na vagina de uma outra cadela utilizando uma seringa. Esse procedimento resultou no nascimento de três filhotes após 62 dias (Johnston *et al.*, 2001).

Somente em 1954 foi descrita por Harrop a primeira IA com sémen canino refrigerado a 4 °C. Após 15 anos, Seager (1969) obteve a primeira gestação utilizando sémen canino congelado, resultando no nascimento de dois filhotes. Nos anos 80, estabeleceu-se a utilização do sémen canino fresco ou refrigerado e os resultados têm se aproximado aos obtidos por monta natural. Porém, os resultados obtidos através da IA com sémen canino congelado são ainda bastante heterogêneos (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989; Silva, 1995). Nesse sentido, o presente estudo apresenta uma revisão geral acerca dos principais aspectos ligados à aplicação da IA na espécie canina.

Coleta e análise seminal

De um modo geral, utiliza-se para a inseminação artificial um macho de escolha do proprietário da cadela a ser inseminada. Entretanto, com o surgimento dos bancos de sémen canino, preconiza-se a realização de uma seleção dos animais doadores. Assim, observa-se que esta seleção pode exercer um marcado efeito sobre a fertilidade, tal qual é descrito para outras espécies, visto que existe uma grande variação individual entre os cães (England, 1993). Por essa razão, a seleção de reprodutores deve ser feita através de uma detalhada anamnese, verificando-se o desempenho reprodutivo anterior do macho e problemas de saúde atuais ou prévios. Deve também ser procedido um cuidadoso exame clínico geral e andrológico, que deve incluir a inspeção e palpação dos órgãos reprodutivos, obser-

* Correspondência: Rua Aracati, 69, Benfica, Fortaleza – Ceará, Brasil, 60020 – 240. Telefone: 00 55 85 2214959, e-mail: legio2000@yahoo.com

vando-se principalmente o tamanho e a consistência testicular, visto que cães com espermatogênese anormal frequentemente têm testículos de consistência inferior à normal. Em seguida, deve-se proceder à coleta e avaliação do sêmen e inspeção do comportamento de monta (lívido), podendo ter continuidade com testes hormonais e análises cromossômicas (Christiansen, 1988, Feldman e Nelson, 1996).

O ejaculado canino é naturalmente dividido em três frações distintas (Harrop, 1955). A primeira fração consiste em um fluido claro originado na próstata e supõe-se ser responsável pela limpeza do canal uretral (England e Allen, 1992). A segunda fração, rica em espermatozoides, é de origem testicular e apresenta volume variável conforme o tamanho testicular e a variação individual, possuindo aspecto turvo, leitoso e opalescente (Christiansen, 1988). A terceira fração é o fluido prostático que deve ser claro e facilmente distinguível da fração espermática. Apresenta um grande volume e serve como um meio diluidor natural proporcionando o transporte dos espermatozoides no trato genital da cadela (England e Allen, 1992).

O sêmen é facilmente colhido de cães, em especial daqueles com experiência prévia de acasalamento. A presença de uma cadela em estro pode melhorar a qualidade do ejaculado, particularmente no caso de cães inexperientes ou tímidos. Pode-se ainda congelar zaragatoas impregnadas de secreções vaginais de cadelas em estro (Silva, 2001) ou impregnadas com o feromônio sintético metil- ρ -benzoato (Goodwing *et al.*, 1979), que podem ser passados na região perianal de uma cadela no momento da coleta do sêmen. Assim, o cão irá reagir como se estivesse diante de uma cadela em cio.

Diversos métodos foram descritos para a coleta de sêmen nesta espécie, tais como: massagem digital, uso de vagina artificial, vibrador elétrico e eletroejaculação (Harrop, 1955; Christiansen, 1988). Segundo Boucher *et al.* (1958), a massagem digital permite a obtenção de um sêmen de qualidade superior ao obtido por vagina artificial, sendo que o primeiro método é especialmente confiável mesmo para cães não condicionados. Althouse *et al.* (1991) observaram que a exposição do sêmen fresco às luvas de látex e/ou vinil causa um imediato decréscimo na motilidade espermática, devendo-se evitar tal contato durante a massagem digital, que é hoje o método de eleição para a coleta do sêmen nesta espécie.

A massagem digital consiste em massagear o prepúcio do cão na altura do bulbo cavernoso peniano, até que o animal atinja a ereção parcial. O prepúcio é então retraído para trás do bulbo e o pênis é apertado com moderada pressão, posteriormente ao bulbo (Seager e Fletcher, 1972; Christiansen, 1988). O ejaculado é coletado fracionadamente com o auxílio de um funil de vidro ou plástico que desemboca em tubos graduados (Gill *et al.*, 1970), devendo-se evitar o contato direto entre o pênis e o material de coleta (Seager

e Fletcher, 1972).

A análise padrão da fração espermática do ejaculado é rotineiramente utilizada para avaliar a qualidade do sêmen canino, incluindo a observação do volume, coloração, viscosidade, pH e osmolaridade. A avaliação microscópica do sêmen inclui a observação da concentração e morfologia espermática, bem como a avaliação subjetiva da porcentagem de espermatozoides móveis na amostra (motilidade) e a qualidade dessa motilidade, denominada de vigor (Christiansen, 1988; Feldman e Nelson, 1996; Johnston *et al.*, 2001). Vale salientar que diversos métodos de análise seminal computadorizada (CASA) já foram validados para a espécie canina, entre eles destacam-se o Analisador de Qualidade Espermática (SQA) e o Hamilton Thorn (HTR), os quais permitem uma avaliação objetiva e precisa dos parâmetros microscópicos seminais (Iguer-Ouada, 2001).

Embora a relação entre a motilidade e a capacidade fecundante do espermatozoide canino não esteja totalmente elucidada, a maioria dos pesquisadores ainda utiliza a motilidade como o principal parâmetro para a avaliação do sêmen canino (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997). Assim, uma amostra normal de sêmen deve exibir uma motilidade mínima de 70% (Christiansen, 1988). Em seguida, deve-se avaliar o vigor espermático, que é a qualidade da motilidade exibida pelos espermatozoides móveis, observada em escala que varia de 0 a 5 (Platz e Seager, 1977). Em 1993, Oettlé demonstrou que a morfologia espermática normal em cães estaria melhor correlacionada com a fertilidade após IA, do que a simples observação da motilidade espermática, sendo que haveria um decréscimo nessa fertilidade caso fossem utilizadas amostras de sêmen apresentando morfologia espermática normal inferior a 60%.

Diversos outros métodos foram descritos para a avaliação da qualidade seminal. Dentre estes, podem ser destacados o teste de termorresistência (Ström *et al.*, 1997), o teste hipo-osmótico (England e Plummer, 1993), o teste de capacitação e reação acrossômica *in vitro* (Hewitt e England, 1998), a análise ultra-estrutural (Rodrigues-Martinez *et al.*, 1993) e os testes de incubação com oócitos homólogos ou heterólogos (Mayenco-Aguirre e Perez-Cortéz, 1998; Metcalf, 1999; Larsson e Rodrigues-Martinez, 2000, Mastro-monaco *et al.*, 2002).

Processamento de sêmen

A IA com sêmen fresco oferece taxas de gestação similares às obtidas com a monta natural (Pereira *et al.*, 2001). Entretanto, o sêmen fresco apresenta pouca flexibilidade, devendo ser utilizado em um curto período após sua coleta. Segundo England (1999), caso o volume ou a concentração espermática não seja suficiente para a IA, deve-se realizar uma nova coleta para incrementar a amostra. Por ocasião da IA, é necessário realizar a expansão da fração espermática, a qual é

geralmente realizada adicionando-se o líquido prostático autólogo até ser atingido o volume mínimo desejado (Nothling e Volkmann, 1993; Uchoa *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002a). Entretanto, pode-se também fazer uso de diluidores, como o Tris (Uchoa *et al.*, 2001), água de coco (Pereira *et al.*, 2001), solução salina fisiológica (Silva *et al.*, 2002a) e o leite desnatado (Betini *et al.*, 2001).

Quando não é necessário o emprego imediato do sêmen, sua viabilidade é prolongada através da refrigeração e da adição de diluidores, como o leite desnatado e a glicina-gema (Cunha e Lopes, 1997), o Tris-gema (Stornelli *et al.*, 2001) e a água de coco (Fontenelle *et al.*, 2002). O sêmen refrigerado apresenta maior flexibilidade que o fresco, podendo ser transportado em garrafas térmicas e manter-se viável por um a cinco dias, desde que a temperatura seja mantida em torno de 4 e 5 °C (Province *et al.*, 1984; England e Ponzio, 1996). Recentemente, Iguer-Ouada (2001) obteve êxito ao prolongar a viabilidade do sêmen canino por mais de 20 dias, através da troca do meio diluidor Tris, conferindo uma renovação de substrato energético para as células espermáticas.

O sêmen canino pode ser ainda congelado e armazenado por tempo indeterminado, permanecendo potencialmente fecundante quando reaquecido e utilizado em IA. Desse modo, o sêmen congelado é o que oferece maior flexibilidade de uso, porém é o que sofre as mudanças mais drásticas quanto à sua qualidade pós-descongelamento (Concannon e Battista, 1989). Diversos diluidores são utilizados para a congelamento do sêmen canino, dentre eles podemos destacar a lactose (Seager, 1969), o Tris (Andersen, 1975), o Triladyl (Nothling *et al.*, 1995), o Biociphos W482 e o Laiciphos 478 (Silva, 1995), o diluidor comercializado pelo Cryogenetics Laboratory of New England - CLONE (Ström *et al.*, 1997) e, mais recentemente, um diluidor à base de água de coco (Cardoso *et al.*, 2003). Entretanto, em diversas publicações, o tampão Tris tem-se mostrado superior a outros diluidores, tanto para a refrigeração, quanto para a congelamento, sendo este o diluidor mais utilizado pela maioria dos grupos de pesquisa da atualidade (Farstad, 1996; Silva *et al.*, 2000).

A gema de ovo de galinha é adicionada ao Tris, geralmente na proporção de 20% (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989; Silva *et al.*, 2003), por promover a proteção da célula espermática contra o choque térmico (Watson e Plummer, 1985; Hammerstedt *et al.*, 1990). Dentre os agentes crioprotetores que podem ser utilizados destacam-se o glicerol (Polge *et al.*, 1949), o dimetilsulfóxido (Olar *et al.*, 1989), o metanol (Kim *et al.*, 1994) e o etileno-glicol (Santos *et al.*, 2001). Entretanto, o glicerol (CH₃H₈O₃) é o crioprotetor mais empregado na congelamento de sêmen canino em concentrações variando entre 2 e 8%, dependendo da composição do diluidor utilizado (Ravaszova *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2003). Finalmente, pode-se ainda adicionar ao diluidor a pasta Equex, que é um aditivo comercial

para sêmen, contendo o dodecil-sulfato, o qual possibilita um aumento na resistência aos danos oriundos da congelamento (Rota *et al.*, 1999).

Diversas metodologias têm sido descritas para a congelamento do sêmen canino e variam de acordo com o diluidor e agentes crioprotetores empregados, preconizando o uso de diferentes velocidades de congelamento. Em todas elas, busca-se minimizar o dano causado ao espermatozóide pelo processamento, visando recuperar um máximo possível de espermatozoides viáveis (Ström *et al.*, 1997). Dentre os diversos métodos existentes, o mais usual é o descrito por Andersen (1975), que serve como base para inúmeros estudos onde têm sido realizadas pequenas modificações nesse método, alcançando excelentes resultados *in vitro* (Ström *et al.*, 1997) e *in vivo* (Rota *et al.*, 1999; Tsutsui *et al.*, 2000). Existem também vários protocolos preconizando diferentes temperaturas e velocidades de descongelamento para o sêmen canino. Usualmente, este processo é realizado sob imersão em banho-maria a temperaturas que variam de 37 °C (Linde-Forsberg, 1991) a 75 °C (Olar *et al.*, 1989). Ademais, a armazenagem do sêmen canino pode ser realizada em pastilhas (Battista *et al.*, 1988), tubos de alumínio de 5 mL (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997) ou, preferencialmente, em palhetas (Cardoso *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003).

Monitoramento do ciclo éstrico da cadela

A problemática da obtenção de sucesso através da IA na espécie canina está diretamente ligada às dificuldades concernentes à determinação do momento ideal para inseminação nessa espécie de fisiologia reprodutiva particular. Segundo Concannon *et al.* (1977) a ovulação ocorreria de maneira sincrônica entre 36 e 50 horas após o pique de hormônio luteinizante (LH). Os ovócitos emitidos não estariam ainda maduros, encontrando-se no estado de vesícula germinativa. A maturação seria então concluída dois a três dias mais tarde com a emissão do segundo corpúsculo polar (Holst e Phemister, 1971; Tsutsui, 1989). A partir desse momento, o ovócito seria fecundável, mas a sua sobrevivência parece ser muito curta, de apenas 24 a 48 horas (Concannon e Battista, 1989). O limite máximo de fecundação se encontraria em torno de 6,5 dias depois do pique de LH (Tsutsui, 1989), sendo o período ideal de fecundação entre três e quatro dias depois do pique. No entanto, esses estudos não nos permitem determinar precisamente o momento e o caráter sincrônico da ovulação (Silva, 1995). Devido a essa problemática, segue-se uma abordagem dos diversos métodos descritos para o monitoramento do ciclo éstrico da cadela, visando a determinação do momento ideal para a realização da IA.

Inicialmente, sugere-se a observação das mudanças anatômicas e comportamentais da cadela que ocorrem principalmente durante o proestro, que dura em torno

de 9 dias, caracterizando-se por edemaciação vulvar, associada a uma descarga serosanguinolenta vaginal, em resposta às altas concentrações de estrogênio. Usualmente, nesse momento, a cadela atrai os machos, mas não permite ser acasalada, mantendo a cauda sobre a vulva e demonstrando um comportamento agressivo (Johnston *et al.*, 2001). A fase subsequente é denominada de estro e caracteriza-se pela vulva aumentada e amolecida, diminuição das descargas vaginais e aceitação do acasalamento pelo macho (Allen, 1992), com exibição da vulva através do afastamento da cauda (Uchoa *et al.*, 2001). No início dessa fase, o estrogênio atinge seu pique máximo, a partir do qual inicia seu declínio. Esse pique de estrogênio promove o pique de LH, que por sua vez é responsável pelo desencadear da ovulação, que irá culminar na elevação dos níveis de progesterona (Concannon *et al.*, 1989).

Outro método prático sugerido para o acompanhamento do ciclo estrico da cadela é a associação da observação de suas mudanças comportamentais e anatômicas com a citologia vaginal. Porém, como este método não é muito preciso, ele fica reservado à inseminação artificial com o sêmen fresco. Assim, tal método se baseia na observação do perfil citológico da cadela, o qual sofrerá mudanças bem características de acordo com as fases do ciclo estrico (Schutte, 1967). A inseminação deve ser realizada quando a fêmea estiver receptiva ao macho e apresentar uma citologia com pelo menos 70% de células epiteliais superficiais. No entanto, uma grande parcela de cadelas candidatas a IA com sêmen fresco são justamente aquelas que têm desvio de comportamento, não aceitando a cópula e não manifestando comportamento sexual normal. Nesses casos, o comportamento não pode ser utilizado como guia, ficando a citologia vaginal como método isolado. Essa última é excelente para guiar o veterinário dentro do ciclo estrico da cadela, mas nem sempre é eficaz quando utilizada isoladamente (Silva *et al.*, 2002b). Segundo England e Allen (1989), além da morfologia celular observada através da citologia vaginal convencional, o padrão de cristalização do muco vaginal das cadelas em estro deve também ser observado, uma vez que o mesmo apresentaria alterações de acordo com o aparecimento do pique estrogênico no decorrer do ciclo estrico.

Uma alternativa para aumentar a eficiência na determinação do momento ótimo para IA é o acompanhamento da cadela por vaginoscopia (Lindsay, 1983). Baseando-se nesse método, o momento ideal para a realização da IA seria quando a mucosa vaginal apresentar pregas fortemente angulosas e de coloração pálida (Johnston *et al.*, 2001). Tanto os endoscópios fibro-ópticos, quanto proctoscópios pediátricos, com diâmetro inferior a 12 mm, podem ser utilizados na maioria das cadelas a fim de se visualizar as mudanças na região cranial da vagina. O uso de ambos os instrumentos requer prática e atenção, no intuito de não causar danos à estrutura anatômica da cadela (Burke, 1986).

O método mais eficiente para se determinar o momento ótimo para a IA é através da dosagem de progesterona plasmática, uma vez que a cadela é a única dentre as fêmeas domésticas que apresenta uma evolução da progesteronemia dois a três dias antes da ovulação (Johnston *et al.*, 2001). Os valores de progesterona sérica são inferiores a 1,0 ng/mL durante o anestro e a maior parte do proestro e rapidamente começam a aumentar nas proximidades do pique de LH (Concannon *et al.*, 1989). A dosagem da progesteronemia é hoje uma prática rotineira que pode ser feita com auxílio de kits semiquantitativos comerciais do *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou por laboratórios especializados que fornecem valores quantitativos obtidos por radioimunoensaio (RIA). O RIA é geralmente o mais acurado das duas técnicas, sendo, entretanto, mais caro e requerendo maior tempo de execução (Johnston *et al.*, 2001). Segundo Johnston *et al.* (2001), o momento ideal para a realização da IA seria dois dias após a progesterona ter atingido concentrações entre 4 e 10 ng/mL. Dosagens paralelas de progesterona e hormônio luteinizante (LH) mostraram que o início da elevação significativa da progesteronemia corresponde ao pique do LH, o qual pode ser uma referência importante para definir-se as datas da inseminação, uma vez que a ovulação costuma ocorrer 48 horas após o pique desse hormônio (Guérin, 1998). Atualmente, testes de RIA e ELISA encontram-se comercialmente disponíveis para a dosagem do LH sérico. No entanto, a mensuração desse hormônio apresenta o inconveniente da necessidade de diversas coletas sanguíneas diárias (Johnston *et al.*, 2001).

Hase *et al.* (2000) investigaram o uso da ultrasonografia como método para prever a ovulação na cadela. Entretanto, a ocorrência da ovulação só foi observada em 54,5% das cadelas estudadas. Por outro lado, Silva *et al.* (1996) já haviam verificado a dificuldade de se determinar a ovulação na cadela por ultrasonografia, em virtude da presença de uma bolsa de tecido conjuntivo circundando o ovário.

Mudanças na resistência elétrica dos fluidos vaginais têm sido utilizadas com sucesso na determinação do momento ideal para a inseminação em Raposas Azuis e Prateadas (Fougner, 1989). Esse método foi também descrito para a espécie canina, tendo sido constatado sucesso, desde que o detector de resistência elétrica seja sempre colocado na mesma posição da vagina da cadela. No entanto, a extensa variação no tamanho da vagina das cadelas nas diversas raças dificulta o procedimento nessa espécie (Johnston *et al.*, 2001).

Vias de inseminação artificial

A IA intravaginal (IAIV) consiste na deposição do sêmen na vagina da cadela e apresenta-se como a via de escolha na maioria dos casos, por ser de fácil execução e por oferecer bons resultados de um modo geral.

Para a IAIV pode-se utilizar uma pipeta rígida de vidro ou plástica, geralmente utilizada para a inseminação de bovinos (Seager e Fletcher, 1972; Seager e Platz, 1977); um pênis artificial, que consiste em um dispositivo plástico preenchido por ar, imitando as dimensões do pênis do cão (Kojima *et al.*, 1996ab) ou a sonda de Osiris (Mialot *et al.*, 1985).

A sonda de Osiris é uma pipeta plástica flexível munida de um pequeno balão inflável na sua extremidade distal, imitando o enchimento dos bulbos erécteis do pênis do cão durante o coito e impedindo o refluxo do sêmen. O balonete evita também o recuo da sonda e estimula o peristaltismo vaginal, tal qual ocorre no coito. Essa sonda realiza a aspersão do sêmen diretamente na porção cranial da vagina (Mialot *et al.*, 1985).

No protocolo clássico de IAIV, recomenda-se a elevação do trem posterior da cadela por 5 a 20 minutos, visando-se evitar o refluxo do sêmen (Seager, 1986). Porém, Pinto *et al.* (1998) observaram que a redução no tempo de elevação do trem posterior de 10 para 1 minuto 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 em dois minutos após a deposição vaginal do sêmen.

A IA por via intrauterina (IAIU), que consiste na deposição do sêmen diretamente dentro do útero, fica reservada para casos particulares, onde a via vaginal poderia comprometer os resultados da IA, como, por exemplo, na utilização de um sêmen congelado com baixa qualidade pós-descongelamento (Silva, 1995). Segundo Johnston *et al.* (2001), a IAIU pode ainda ser utilizada como uma alternativa para melhorar as taxas de fertilidade de machos oligospermicos, ou seja, com um baixo número de espermatozoides no ejaculado.

Várias abordagens têm sido realizadas com o intuito de se desenvolver técnicas para a IAIU, na qual a deposição do sêmen é realizada diretamente dentro do útero da fêmea por via transcervical ou através de procedimentos cirúrgicos transabdominais como a laparotomia e laparoscopia.

A IAIU via transcervical não é uma técnica fácil de ser executada e, em alguns casos, a tranquilização do animal pode ser necessária. O cateterismo cervical foi adaptado para a espécie canina a partir de experimentos prévios realizados na raposa azul (Fougner *et al.*, 1973). Na cadela, esta técnica exige destreza do operador devido à anatomia particular do cérvix e à presença da prega médio-dorsal da vagina (Pineda *et al.*, 1973; Linde, 1978; Lindsay, 1983). Assim, para sua execução são utilizados uma bacia plástica e o catéter escandinavo, o qual é transpassado através do cérvix, sendo este palpado por via abdominal, permitindo a deposição do sêmen diretamente no corpo uterino. O catéter escandinavo consiste em um catéter metálico com 0,75 a 1,0 mm de diâmetro, sendo comercializado em três diferentes tamanhos: 20, 30 ou 40 cm (Andersen, 1975).

A IAIU por laparotomia foi desenvolvida no intuito de transpor as dificuldades do cateterismo cervical. No entanto, essa técnica comporta uma intervenção cirúrgica com todos os riscos implícitos. Além disso, uma anestesia profunda poderia interferir na motilidade uterina e na migração oocitária (Tsutsui *et al.*, 1989).

A IAIU por laparoscopia, apesar de ser considerada uma técnica semicirúrgica, tem caráter pouco invasivo e é de rápida execução, uma vez que o sêmen pode ser depositado em apenas um corno uterino, haja vista que os espermatozoides rapidamente migram para o outro corno (Tsutsui *et al.*, 1989). Os resultados obtidos após IAIU por laparoscopia, tanto com sêmen fresco, como com sêmen congelado, têm sido satisfatórios (Silva, 1995).

Em alguns países europeus, a realização de inseminações por métodos cirúrgicos, existindo a possibilidade do procedimento não-cirúrgico, é considerada antiética (Farstad, 2000). Assim, a endoscopia vaginal parece ser o método do futuro para a sondagem do colo uterino, uma vez que ela possui a grande vantagem de possibilitar a visualização da abertura do cérvix sem a necessidade de sedação do animal (Wilson, 1993; Shin *et al.*, 1997). Segundo Wilson (1993), esse método proporcionaria taxas de concepção em torno de 80%, mesmo com a utilização do sêmen congelado. Para sua execução, é utilizado um endoscópio fibro-óptico rígido conectado a uma fonte luminosa e um cateter urinário, sendo necessária a palpação abdominal para auxiliar a guiar tais instrumentos.

Eficiência da inseminação artificial

A IA com sêmen canino fresco, contendo um número adequado de espermatozoides, proporciona resultados de fertilidade similares àqueles obtidos pela monta natural (Pereira *et al.*, 2001; Uchoa *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002a), a qual, segundo Daurio *et al.* (1987), apresenta eficiência em torno de 85% nesta espécie.

No uso do sêmen refrigerado, Pinto *et al.* (1999) obtiveram 90% e 100% de fertilidade em cadelas submetidas a IAIV com sêmen refrigerado por 24 e 48 horas, respectivamente. Mas, segundo Guérin (1998), os resultados são geralmente inferiores àqueles obtidos com o sêmen fresco, sendo obtida uma taxa de fertilidade em torno de 70%. Além disso, o sucesso desse método estaria dependente de uma boa coordenação entre o envio do sêmen e o momento de realização da inseminação.

As taxas de concepção observadas após IA com sêmen congelado são sensivelmente inferiores às obtidas com sêmen fresco (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989). Esse fato é provavelmente devido à viabilidade e fecundidade reduzida dos espermatozoides congelados. Isso pode ser devido ao processo de congelamento e descongelamento, à qualidade do sêmen após congelamento,

aos tipos de meios utilizados, dentre outros fatores. De fato, segundo Concannon e Battista (1989) e Fontbonne e Badinand (1993b), a viabilidade do espermatozóide após descongelamento pode variar de 12 a 24 horas.

Ademais, no uso de sêmen congelado, as taxas de concepção são geralmente mais altas quando o sêmen é depositado no útero, comparado à deposição vaginal (Olar *et al.*, 1989; Concannon e Battista, 1989). Entretanto, Silva (1995) descreve 100% de gestação para a IAIU por laparotomia e a IAIV utilizando-se a sonda de Osíris com o sêmen congelado, o que implica que a própria metodologia de inseminação pode influenciar os resultados. Resultados semelhantes foram também descritos por Fontbonne e Badinand (1993a), os quais encontraram taxa de fertilidade de 52,6% a partir de IAIV com a sonda de Osíris, e 73,6% em IAIU transcervical por cateterismo, não sendo evidenciadas diferenças estatísticas entre os dois métodos.

Com relação ao número de IA, Uchoa *et al.* (2001) e Silva *et al.* (2002a) sugerem a realização de duas inseminações, geralmente, com intervalos de 48 horas, utilizando o sêmen a fresco. Esse mesmo número de inseminações é sugerido por Silva (1995) para a utilização de sêmen congelado. Ademais, no uso de sêmen refrigerado por até 11 dias, Iguer-Ouada (2001) obteve 50% de fertilidade após a realização de uma única IA.

O número mínimo de espermatozoides requerido para a IA não está bem estabelecido. Taxas de fertilidade satisfatórias já foram obtidas com doses inseminantes de 35×10^6 espermatozoides móveis após IAIU e de 50×10^6 espermatozoides móveis após IAIV (Wilson, 1993). De um modo geral, a IAIU requer uma menor concentração de espermatozoides por IA do que a técnica de IAIV.

Segundo Guérin (1998), a fertilidade entre as raças é bastante variável, sendo ainda constatado que o número de espermatozoides por ejaculado varia proporcionalmente de acordo com o tamanho do cão. Assim, talvez seja necessário aumentar a dose inseminante para as raças de grande porte, uma vez que esse maior número de espermatozoides poderia estar correlacionado a um maior comprimento do aparelho genital da cadela.

Considerações finais

Apesar da difundida utilização da IA na espécie canina na atualidade, são necessários ainda um maior conhecimento e controle dos fatores que podem influenciar seu sucesso. Assim, diversos estudos continuam a ser conduzidos visando encontrar metodologias de preservação de gametas que permitam uma perda mínima da qualidade seminal, uma maior eficácia na determinação do momento ideal para a inseminação e utilização de uma via eficiente que não traga riscos ao animal.

Entende-se, desse modo, que a IA em cães seria apenas o começo de uma nova era para a reprodução

e otimização do material genético de canídeos domésticos e selvagens, uma vez que as biotecnologias estabelecidas para a espécie canina poderiam servir como base para estudos visando a preservação e difusão do material genético oriundo de canídeos selvagens ameaçados ou em extinção, haja vista a similaridade filogenética entre tais espécies (Wayne e Vila, 2001).

Bibliografia

- Allen, W.E. (1992). *Fertility and Obstetrics in the Dog*. Blackwell Scientific Publications (Oxford).
- Althouse, G.C., Ko, J.C.H., Hopkins, S.M., Evans, L.E. (1991). Effect of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoal motility. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 199, 227-229.
- Andersen, K. (1975). Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchtygiene*, 10, 1-4.
- Battista, M., Parks, J., Concannon, P. (1988). Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using pipes, lactose, tris or test extenders. *Proceedings 11° International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*, 3, 229.
- Betini, C.M., Moraes, G.V., Rigolon, L.P. (2001). Inseminação artificial de cadelas com sêmen fresco diluído em meios formulados com água de coco e leite em pó desnatado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25 (3), 373-375.
- Boucher, J., Foote, R.H., Kirk, R.W. (1958). The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of sperm reserves. *Cornell Veterinary*, 48, 67-86.
- Burke, T.J. (1986). *Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment*, Ed. Lea & Febiger (Philadelphia).
- Cardoso, R.C.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. (2003). Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, 59, 743 - 751.
- Christiansen, I.J. (1988). *Reprodução no cão e no gato*. Editora Manole (São Paulo).
- Concannon, P.W., Hansel, W., McEntee, K. (1977). Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biology of Reproduction*, 17, 604-613.
- Concannon, P.W., McCann, J.P., Temple, M. (1989). Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 39, 3-25.
- Concannon, P.W., Batista, M. (1989). Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy*, 10, 1247-1259.
- Cunha, I.C.N., Lopes, M.D. (1997). Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino, utilizando-se diluidores à base de leite e glicina gema. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 21 (2), 1997.
- Daurio, C.P., Gilman, M.R., Pulliam, J.D., Seward, R.L. (1987). Evaluation of male Beagles and safety of ivermectin. *American Journal of Veterinary Research*, 48, 1755-1760.
- England, G.C.W. (1993). Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47, 243 -255.
- England, G. C. W., Ponzio, P. (1996). Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, 46, 165-171.
- England, G.C.W., Allen, W.E. (1989). Crystallization patterns in anterior vaginal fluid from bitches in oestrus. *Journal of Reproduction and Fertility*, 86, 335-339.

- England, G.C.W., Allen, W.E. (1992). Factors affecting the viability of canine spermatozoa II: Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, 37, 373 – 381.
- England, G.C.W., Plummer, J.M. (1993). Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 261 – 270.
- England, G.C.W. (1999). Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*, 52, 981-986.
- Farstad, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, 42, 251-260.
- Farstad, W. (2000). Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53, 175-186.
- Feldman, E.C., Nelson, R.W. (1996). Canine and feline endocrinology and reproduction. W. B. Saunders Company (Philadelphia).
- Fontbonne, A., Badinand, F. (1993a). Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 325-327.
- Fontbonne, A., Badinand, F. (1993b). Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 531-532.
- Fontenelle, P.S., Cardoso, J.F.S., Cardoso, R.C.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. (2002). Conservação a 5 °C do sêmen canino diluído em água de coco. *Ciência Animal*, 12, 153-156.
- Fougner, J.A., Aamdal, J., Andersen, K. (1973). Intrauterine insemination with frozen semen in the blue fox. *Nordic Veterinary Medicine*, 25, 144-149.
- Fougner, J.A. (1989). Artificial insemination in fox breeding. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 39, 317-323.
- Gill, H.P., Kanfran, C.F., Foote, R.F., Kirk, R.W. (1970). Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen. *American Journal of Veterinary Research*, 31, 1807-1813.
- Goodwin, M., Gooding, K.M., Regnier, F. (1979). Sex pheromone in the dog. *Science*, 203: 559-561.
- Guérin, C. (1998). A inseminação artificial na espécie canina. *A Hora Veterinária*, 105, 25-32.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11, 73-88.
- Harrop, A.E. (1954). Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Veterinary Record*, 110, 194-196.
- Harrop, A.E. (1955). Some observations on canine semen. *Veterinary Record*, 67, 494-498.
- Hase, M., Hori, T., Kawakami, E., Tsutsui, T. (2000). Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis systems in dogs. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 62 (3), 243-248.
- Hewitt, D.A., England, G.C.W. (1998). An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Animal Reproduction Science*, 51, 321-332.
- Holst, P. A., Phemister, R. D. (1971). The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biology of Reproduction*, 5, 194 – 206.
- Iguer-Ouada, M. (2001) *Medically assisted procreation in Canine Species: Analyses and 4 °C preservation of semen*. Tese (Doutorado) Université de Liège, Liège, 219p..
- Ivanova-Kicheva, M.G., Bobadov, N.D., Somlev, B. (1997). Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. *Theriogenology*, 48, 1343-1349.
- Johnston, S.D., Kustritz, M.V.R., Olson, P.N.S. (2001). Canine and feline theriogenology. W.B.Saunders (Philadelphia).
- Kim, Y.J., Park, Y.J., Kim, B.J., Yu, I.J. (1994). Artificial insemination with frozen semen in the dog – simple freezing method using methanol. *Korean Journal of Veterinary Research*, 34(4), 851-855.
- Kojima, Y., Kawakami, W., Shino, M., Ohchi, T. (1996a). A small trial on a new insemination technique with fresh dog semen using the artificial penis. *Journal of Reproduction and Development*, 42 (5), 39-41.
- Kojima, Y., Kawakami, W., Shino, M., Ohchi, T. (1996b). Preliminary test of artificial insemination in the dog – intrauterine transportation of liquid using the artificial penis. *Journal of Reproduction and Development*, 42 (5), 35-38.
- Larsson, B., Rodríguez-Martínez, H. (2000). Can we use in vitro fertilization to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science*, 60-61, 327-336.
- Linde, C. (1978). Transport of radiopaque fluid into the uterus after vaginal deposition in the oestrous bitch. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 19, 463-465.
- Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. (1989). Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 39, 299-310.
- Linde-Forsberg, C. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21 (3), 467-485.
- Lindsay, F.E.F. (1983). The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post-uterine endoscopy. *Journal of Small Animal Practice*, 24, 1-15.
- Mastromonaco, G.F., Hay, M.A., Goodrowe, K.L. (2002). The effect of oocyte storage and Cumulus cell presence on canine zone penetration by domestic dog spermatozoa. *Theriogenology*, 57, 1123-1134.
- Mayenco-Aguirre, A.M., Pérez-Cortés, A.B. (1998). Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology*, 50 (2), 195-204.
- Metcalf, S. (1999). Assisted reproduction in the bitch. Thesis (Master of Sciences). Institute of Reproduction and Development – Faculty of Science, Monash University, Australia, 161p.
- Mialot, J.P., Dumon, C., Cassou, B. (1985). Insémination artificielle chez la chienne: Mise en place de sémence fraîche avec le pistolet souple “Osiris”, *Pratique Médicale et Chirurgicale de l’Animal de Compagnie*, 20 (3), 213-220.
- Nöthling, J.O., Volkmann, D.H. (1993). Effects of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 335-341.
- Nothling, J.O., Gerstenberg, C., Volkmann, D.H. (1995). Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen – a retrospective study. *Journal of South Africa Veterinary Association*, 66, 49-55.
- Oettle, E.E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 257-260.
- Olar, T.T., Bowen, R.A., Pickett, B.W. (1989). Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, 31, 451-461.
- Pereira, B.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Cardoso, R.C.S., Silva, L.D.M. (2001). Comparação da monta natural e inseminação artificial com sêmen diluído em água de coco em cadelas da raça Boxer. *Ciência Animal*, 11 (2), 97-100.
- Pineda, M.H., Kainer, R.A., Faulkner, L.C. (1973). Dorsal median postcervical fold in the canine vagina. *American Journal of Veterinary Research*, 34, 1487-1491.
- Pinto, C.R.F., Eilts, B.E., Paccamonti, D.L. (1998). The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemina-

- tion in bitches. *Theriogenology*, 50, 301-305.
- Pinto, C.R.F., Paccamonti, D.L., Eilts, B.E. (1999). Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, 52, 609-616.
- Polge, C., Smith, A.U., Parkers, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, 164, 166.
- Platz, C.C., Seager, S.W.J. (1977). Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Laboratory Animal Science*, 27, 1013 – 1016.
- Province, C.A., Amann, R.P., Pickett, B.W., Squires, E.L. (1984). Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5 °C. *Theriogenology*, 22, 409-415.
- Ravaszova, O., Mesaros, P., Cingakova, V., Lukacinova, M. (1996). A study of the properties of dog ejaculate during long-term storage. *Folia Veterinaria*, 40, 95-99.
- Rodrigues-Martinez, H., Ekwall, H., Linde-Forsberg, C. (1993). Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 279-285.
- Rota, A., Iguer-Ouada, M., Versteegen, J., Linde-Forsberg, C. (1999). Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, 51 (6), 1045-1058.
- Santos, S.E.C., Vannucchi, C.I., Satzinger, S., Visintin, J.A. (2001). Comparação de dois crioprotetores na congelação de sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25(3), 472-473.
- Schutte, A.P. (1967). Canine Vaginal Cytology-II. Cyclic Changes. *Journal of Small Animal Practice*, 8, 307-311.
- Seager, S. W. J., Platz, C. C. (1977). Artificial insemination and frozen semen in the dog. *Veterinary Clinics of North America*, 7, 757-764.
- Seager, S.W.J., Fletcher, W.S. (1972). Collection, storage and insemination of canine semen. *Laboratory Animal Science*, 22, 177-182.
- Seager, S.W.J. (1986). Artificial insemination in dogs. Em: *Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment*, Ed. T.J. Burke. Lea & Febiger, Philadelphia. Pp. 207-210.
- Seager, S.W.J. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *Artificial Insemination Digest*, 17-26.
- Shin, N.S., Moon, Y.S., Chung, D.H., Kim, Y.J. (1997). Artificial insemination with frozen canine semen using vaginal endoscope. *Korean Journal of Veterinary Clinical Medicine*. 14(2), 297-300.
- Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Silva, L.D.M. (2000). Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. *Ciência Rural*, 6, 1021-1025.
- Silva, A.R., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. (2002a). Uso da sonda de Osiris na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Rottweiler. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 5, 147-149.
- Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. (2003). Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59, 821-829.
- Silva, L.D.M. (1995) Procréation medicalelement assistée dans l'espèce canine. Investigations morpho-fonctionnelles et optimisation des techniques permettant d'arriver à la maîtrise de la reproduction. Tese (Doutorado) Université de Liège, Liège, 173p.
- Silva, L.D.M. (2001). Avanços da inseminação artificial na espécie canina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25 (2), 107-111.
- Silva, L.D.M., Onclin, K., Versteegen, J.P. (1996). Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches by ultrasonography, laparoscopy and hormonal assays. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 37, 4, 313-320.
- Silva, L.D.M., Silva, A.R., Cardoso, R.C.S. (2002b). Inseminação artificial em cães. Em: *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. Eds. P.B.D. Gonsalves, J.R.F. Figueiredo, V.J.F. Freitas. Varela, São Paulo. Pp.69-95.
- Stornelli, M.A., Stornelli, M.C., Arauz, M.S., Savignone, C.A., García, M., De La Sota, R.L. (2001). Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado refrigerado a 4 °C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25 (3), 468-470.
- Ström, B., Rota, A., Linde-Forsberg, C. (1997). In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*. 48, 247-256.
- Tsutsui, T. (1989). Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 39, 269-275.
- Tsutsui, T., Kawakami, E., Murao, I., Ogasa, A. (1989). Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: Observations through uterine fistula. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 51, 560-565.
- Tsutsui, T., Hase, M., Tanaka, A., Fujimura, N., Hori, T., Kawakami, E. (2000). Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of orvus ES paste-supplemented egg yolk Tris-fructose citrate. *Japanese Veterinary Medical Science*, 62, 603-606.
- Uchoa, D.C., Silva, A.R., Silva, T.F.P., Silva, L.D.M. (2001). Inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Bassethound utilizando a Sonda de Osiris®. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 25 (3), 371-373.
- Watson, P.F., Plummer, J.M. (1985). The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. *Proceedings 1st. International Conference on Deep Freezing of Boar Semen*, 113-117.
- Wayne, R.K., Vila, C. (2001). Phylogeny and origin of the domestic dog. Em: *The genetics of the dog*, Eds. A. Ruvinsky, J., Sampsom, CAB International. Pp. 1-13.
- Wilson, M.S. (1993). Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen, *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 307-311.