

Inseminação artificial *a fresco* em uma fêmea bulldog inglês: relato de caso

(The fresh artificial insemination in one female english bulldog: case report)

KARLING, Paula Catiana¹; ROQUE, Wilson Canassa²; OLSSON, Débora Cristina³

¹ Médica Veterinária Autônoma – Itapiranga, SC.

² Médico Veterinário, Autônomo, Criciúma, SC.

³ Professor Adjunto do Instituto Federal Catarinense-Concórdia – IFC

Artigo enviado em: 28/02/2017, aceito para publicação em 28/04/2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/revcivet.v4i2.35671>

RESUMO

Este relato de caso teve como objetivo descrever uma técnica de inseminação artificial (IA) modificada, em uma fêmea Bulldog Inglês, utilizando-se como método de inseminação artificial vaginal *a fresco*. Após detecção do cio, por citologia vaginal, com células superficiais acima de 80%, utilizou-se cerca de 5ml de sêmen *a fresco*, colhido por método de estimulação manual, com uma seringa estéril de 10ml. Os membros pélvicos da fêmea foram elevados dorsalmente e através de uma pipeta comercial, o sêmen foi introduzido na região do vestibulo vaginal. A técnica foi repetida três vezes e decorrido 27 dias do início do protocolo, detectou-se por exame ultrassonográfico a imagem sugestiva de cinco fetos viáveis. Concluiu-se que a técnica descrita utilizando sêmen *a fresco* é de fácil aplicabilidade e alta viabilidade.

Os métodos utilizados para avaliar os parâmetros comportamentais e reprodutivos foram eficazes para determinar o período de IA. A quantidade de sêmen foi suficiente para uma gestação com boa taxa de prenhez.

PALAVRAS-CHAVE: sêmen, citologia vaginal, gestação, cão.

ABSTRACT

This case report describes a method of artificial insemination in a female English Bulldog. Estrus was confirmed by vaginal cytology, ie more than 80% keratinized cornified epithelial cells. The bitch was restrained standing with hind limbs elevated and approximately 5ml of fresh semen, collected by manual stimulation, was introduced into the vaginal vestibule using a pipette. Insemination was repeated three times. At 27 days from the first insemination five viable fetuses were detected on ultrasound examination. This insemination technique, using fresh semen, is simple to perform and can be successful. The methods used to evaluate the behavioral and reproductive parameters were effective in determining the insemination period. The amount of semen was sufficient for a pregnancy with a good pregnancy.

KEY WORDS: semen, vaginal cytology, gestation, dog

INTRODUÇÃO

Durante muitos anos as pesquisas voltadas às biotecnologias estavam restritas apenas aos animais de produção, porém, na década de 90 a comunidade científica passou a estudar a espécie canídea, como forma de preservar a biodiversidade animal (RIBEIRO *et al.*, 2010).

Atualmente muitos são os proprietários que procuram auxílio veterinário para que seus animais de companhia procriem, sendo esse desejo baseado em motivos financeiros ou afetivos (CARDOSO, 2012). A técnica de inseminação artificial (IA) é amplamente utilizada em diversas espécies como bovinos, equinos, caprinos, suínos e canídeos, com resultados satisfatórios, tendo como um dos objetivos o intuito de obter descendentes de progenitores com incapacidade de realizar a cobertura ou subfértéis (LEÃO, 2003; SCHAEFER-SOMI *et al.*, 2015).

Existem inúmeros relatos sobre a origem da IA, uma delas conta à lenda que um árabe colheu o sêmen de um garanhão de uma tribo rival com auxílio de um algodão, posteriormente introduzido na genitália de uma égua em cio, resultando o nascimento de um potro. Porém, coube ao monge Lazzaro Spallanzani (1780) realizar

a colheita de sêmen de um canídeo para inseminar uma cadela (NOVAES e BISCEGLI, 1997). Já no final da década de 40, foi demonstrado que os espermatozóides poderiam ser conservados em baixas temperaturas por tempo indefinido; antes dessa descoberta o sêmen era mantido e refrigerado a 5°C por um período de 96 horas (ASBIA, 2010).

A IA é um meio alternativo para impossibilidades de realização da cópula ou utilização de sêmen fresco, resfriado ou congelado, podendo estar associado à técnicas de monitoramento éstrico, como por exemplo a citologia vaginal, vaginoscopia e dosagens hormonais (SILVA *et al.*, 2003),

Várias são as peculiaridades da espécie canídea em relação à ovulação, fertilização e desenvolvimento embrionário, fatores esses que devem ser considerados para o sucesso reprodutivo (SCHAEFER-SOMI *et al.*, 2015). Os oócitos canídeos são liberados em estágio imaturo, o que torna difícil determinar o momento exato da ovulação, além desse aspecto também se deve considerar que o sêmen permanece no trato reprodutivo de forma viável por um longo período, o que dificulta a determinação cronológica do desenvolvimento fetal, sendo que esses fatores são necessários para escolha da

biotécnica adequada (DERUSSI e LOPES, 2009).

A importância desta discussão está em demonstrar a prática de uma técnica de inseminação em animais de companhia, não invasiva, de fácil aplicação, capaz de propiciar maiores taxas de fertilidade com a deposição do sêmen no interior do útero. Adicionalmente, a deposição do sêmen no ambiente intrauterino permite a utilização de menores doses inseminantes, sem prejuízo na taxa de gestação, permitindo otimizar a utilização do sêmen canídeo. O presente artigo tem como objetivo relatar um caso de IA modificada em uma fêmea canídea da raça Bulldog Inglês, com efetivo sucesso neonatal.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A fêmea canídea possui inúmeras particularidades em relação a sua fisiologia reprodutiva quando comparada às demais fêmeas mamíferas (SERAFIM, 2009). A cadela é classificada como monoéstrica, seu ciclo estral compreende em três fases características: o proestro, o estro e o diestro; subsequente a essas fases ocorre um período de inatividade das funções ovarianas denominado de anestro (CHIRINEA, 2008). Há uma variação individual e racial quanto ao intervalo entre os ciclos éstricos (SERAFIM, 2009).

O anestro pode variar de 40 à 270 dias tendo como média de 120 dias. O diestro que corresponde à fase lútea tem em média 65 dias, porém, sua duração pode ser de 60 a 90 dias. O proestro varia de dois a 15 dias tendo em média nove dias de duração e o estro pode variar também de dois a 15 dias, porém, sua média é de aproximadamente dez dias. Essa variação do proestro e estro interferem no procedimento de cruzamento ou IA e nos índices de fertilidade (ALVES *et al.*, 2002).

Nas fêmeas, os estrógenos circulantes têm uma ligeira elevação trinta dias antes do início do proestro, fazendo com que a canídea apresente poliaquiúria como forma de difundir ferormônios e atrair os machos (CHIRINEA, 2008). Os folículos em crescimento promoverão o aumento subsequente dos estrógenos circulantes determinando assim o aparecimento de corrimento vulvar sanguinolento, edema de vulva e das pregas vaginais, queratinização e espessamento da mucosa vaginal. Somente no final do proestro ocorrerá o pico sérico de estrógeno servindo de estímulo para a liberação do hormônio luteinizante (LH) e para a ovulação que ocorrerá em aproximadamente 48 horas após o pico de LH tendo uma duração inferior a 24 horas (ALVES *et al.*, 2002; SERAFIM, 2009).

Os oócitos canídeos são liberados ainda imaturos, desencadeando assim um mecanismo de maturação pré-ovulatória, que torna necessária a permanência dos mesmos por um período de dois a cinco dias nos ovidutos, para que se complete a maturação, e estes estejam aptos à fecundação (ROCHA *et al.*, 2007). Durante esse período de maturação, a fêmea já aceita a cópula, permitindo assim o contato dos oócitos com os espermatozóides, entretanto, o tempo adicional necessário para que ocorra a maturação dos oócitos torna difícil determinar o momento da ovulação (DERUSSI e LOPES, 2009).

O sistema reprodutor da cadela passa continuamente por alterações relacionadas ao ciclo estral, o que faz necessário que se estabeleça critérios para identificação dos estágios e o período de maior fertilidade da fêmea e assim, realizar a IA ou a cobertura natural (OLIVEIRA e MARQUES, 2003). O monitoramento éstrico além da determinação do período fértil auxilia na determinação da data do parto (ALVES *et al.*, 2002).

O conhecimento da fisiologia do ciclo estral é importante para diagnosticar problemas de infertilidade já que muitas fêmeas caníneas tidas como inférteis são fisiologicamente normais, mas, submetidas a manejos reprodutivos inadequados ou

acasalados com machos que possuem alterações reprodutivas (LANNA *et al.* 2012).

Muitas são as técnicas para monitorar o ciclo éstrico. Recursos como a citologia vaginal, a vaginoscopia, as dosagens hormonais além da ultrassonografia podem ser utilizados com esse intuito (SILVA *et al.*, 2003). A colheita de material para avaliação citológica pode ser efetuada com auxílio de uma escova ginecológica, introduzida pelo canal vaginal (BICUDO e MAMPRIM, 2010). O material colhido deve ser repassado para lâminas que posteriormente serão coradas com coloração do tipo Panótico e avaliadas com auxílio de microscopia onde o resultado obtido se dará a partir da proporção de células superficiais presentes (SILVA *et al.*, 2003).

A dosagem plasmática de progesterona é o método mais eficiente para determinar o período fértil na cadela, a primeira dosagem deve ser realizada no final do proestro ou início do estro para identificar o momento que ocorre o pico de LH; a segunda dosagem deve ser realizada após dois a três dias para determinar o momento da ovulação; a terceira dosagem efetuada tem o objetivo de confirmar a ocorrência da ovulação e pode ser

realizado dois a três dias após a segunda dosagem (ALVES *et al.*, 2002).

Além da fêmea, o macho também deve ser submetido a uma avaliação clínica. A anamnese e o exame físico reprodutivo completo devem ser realizados antes de o macho ser selecionado e ter seu sêmen colhido (CUNHA, 2008).

A IA com sêmen fresco é a técnica utilizada para substituir a monta natural dos canídeos (NEULS, 2007), também previne inúmeras doenças infecciosas que provocam aborto e esterilidade, sendo possível optar por reprodutores com alguma característica desejável e perpetuá-la, além da utilização do sêmen de uma única colheita para se inseminar diversas fêmeas (SÁNCHEZ, 2009).

O início de uma gestação depende das interações biológicas entre a mãe e o conceito (LANNA *et al.*, 2012), enfatizando que a fertilidade envolve diversos processos; desde a concepção, implantação e estabelecimento da gestação culminando com o parto (GRADELA e HORNOS, 2008). As fêmeas canídeas de raças braquicefálicas como o Bulldog e algumas raças de Terriers, como o Boston Terrier e Scottish Terrier, apresentam com frequência distocias obstrutivas por desproporção feto-materna (LUZ *et al.*, 2005; COSTA, 2010). Orienta-se que seja importante realizar um exame

adequado da paciente apresentando esse quadro, para que o tratamento a ser empregado seja o mais correto e seguro (COSTA, 2010). A raça Bulldog é extremamente suscetível a parto laborioso. Em estudo onde se submeteu fêmeas dessa raça a IA cerca de 75% delas necessitaram de cesariana (JACOMINI *et al.*, 2006).

As desvantagens de uma IA estão relacionadas à extensão e distribuição anatômica de um processo inflamatório que podem ser resultados de uma infecção ascendente por microrganismos que normalmente habitam no trato genital inferior e ou provocada durante uma IA, ou até mesmo por instrumentos não estéreis e descartáveis e manobras utilizadas durante a técnica (TILLEY e SMITH, 2003).

Altas taxas de concepção têm sido relatadas na IA com sêmen fresco e refrigerado e a qualidade do sêmen refrigerado tem se mostrado superior ao congelado (CORRÊA, 2009). Quando o sêmen necessita ser transportado para proposta de IA, dois métodos podem ser utilizados: o sêmen congelado (-196°C) e o refrigerado (5°C) (ENGLAND; PONZIO, 1996). As baixas temperaturas diminuem as taxas metabólicas do espermatozóide e prolongam sua longevidade (WATSON, 1995). Apesar do curto período de armazenamento da técnica de refrigeração, a vantagem é que a qualidade do sêmen

refrigerado é superior à do congelado (ENGLAND e PONZIO, 1996), sendo uma técnica viável para curtos períodos de armazenamento. Ademais, a técnica de refrigeração apresenta menor custo, outra vantagem do sêmen refrigerado, em relação ao congelado, é o menor dano às células espermáticas, com taxas de gestação superiores (STORNELLI *et al.*, 2001). Contudo, com longos períodos de estocagem, o sêmen refrigerado se deteriora (ENGLAND e PONZIO, 1996). Quanto ao sêmen congelado, embora possa ser armazenada por longos períodos (anos), a viabilidade e longevidade espermática são prejudicadas e, conseqüentemente, a fertilidade (OETTLÉ, 1986; ENGLAND, 1993; CORRÊA, 2009).

A diluição do sêmen é fundamental para a técnica de criopreservação, pois os componentes adicionados propiciam condições ideais à sobrevivência dos espermatozoides, além de padronizar as concentrações do sêmen que irão passar pelo processo de congelamento (BUENO, 2000). O diluidor a base de Tris apresenta superioridade em relação ao vigor e menores resultados de alterações espermáticas quando comparado ao uso de diluidores à base de água de coco, acrescido de 20% de gema de ovos e 6% de glicerol (SILVA *et al.*, 2000). A temperatura de manutenção do sêmen

refrigerado varia entre 4 e 5°C (MENDONÇA, 2010).

Macedo (2009) obteve taxa de prenhez de 90% utilizando sêmen canídeo fresco e a técnica de inseminação intra-uterina transcervical. Por sua vez Jacomini *et al.* (2006) obtiveram um índice de 75% de prenhez com média de 6,17 filhotes, utilizando sêmen fresco e técnica de IA intra-vaginal.

Para IA intravaginal pode ser utilizada uma bainha de transferência de embriões bovino seccionada ao meio, acoplada a uma seringa por meio de uma mangueira de silicone. Indica-se introduzir a pipeta primeiramente ventralmente em um ângulo de 45°C em seguida direcionado a mesma horizontalmente, quando encontrasse resistência a passagem da sonda, deposita-se 3ml de sêmen e mantêm-se a região pélvica da fêmea elevada por 10 minutos, enquanto realiza-se massagem na vulva da mesma (JACOMINI *et al.*, 2006). A inseminação intrauterina é indicada quando o sêmen é congelado ou de baixa qualidade (JACOMINI *et al.*, 2006; CORRÊA, 2009).

O sêmen congelado pode ser inseminado diretamente no útero com o auxílio de um cateter norueguês, cateter de aço revestido por uma bainha plástica, introduzido por via vaginal transpassando a

cérvix, e depositando o sêmen no corpo do útero (ROMAGNOLI, 2002). Técnicas cirúrgicas e por laparoscopia também podem ser empregadas para a inseminação intrauterina, propiciando uma taxa de concepção de 60% a 70% (JACOMINI *et al.*, 2006).

Doses inseminantes de sêmen congelado nas quantidades de 160×10^6 espermatozoides/2 ml, por via intrauterina e intravaginal, obtiveram como resultados uma taxa de 66,6% na técnica de inseminação intrauterina e 16,6% por via intra-vaginal, o que destaca a importância da qualidade do sêmen e a via de IA utilizada (CHIRINEA, 2008).

RELATO DE CASO

Foi atendida em uma Clínica Veterinária, em Criciúma, SC, uma fêmea canídea da raça Bulldog Inglês, com aproximadamente três anos de idade e histórico de duas tentativas sucessivas, nos dois últimosaios, de IA com um único procedimento de aplicação de sêmen, sem sucesso de prenhez.

Durante a anamnese a fêmea apresentava sinais comportamentais sugestivos de presença de estro como: lordose, edema vulvar, corrimento vaginal sanguinolento, poliaquiúria e submissão ao macho, no entanto sem aceitação deste. Em

seguida direcionou-se o exame físico ao sistema reprodutivo efetuando-se avaliação ginecológica com observação do tamanho vulvar, posição e presença ou não de secreção. A inspeção vaginal foi realizada através de espéculo e vaginoscopia onde se colheu através de *swab* estéril, embebido em solução fisiológica, material tissular das mucosas para exame de citologia vaginal.

O exame de citologia vaginal procedeu-se segundo técnica descrita por Stein *et al.* (2009). Foi introduzido o *swab* em duas etapas via vestibulo e vulva, realizando-se movimentos de rotação contra a mucosa facilitando a colheita das células do epitélio vaginal. O material obtido foi transferido para duas lâminas de microscopia, respectivamente, que foram identificadas, coradas e fixadas por panótico rápido. O resultado da celularidade vaginal foi abaixo de 80% de células superficiais (ALVES *et al.*, 2002; STEIN *et al.*, 2009).

Após dez dias a paciente foi submetida a novo exame físico e citológico vaginal seguindo a mesma técnica de manejo. O novo exame confirmou presença de células superficiais anucleadas e cornificadas acima de 80% (ALVES *et al.*, 2002; STEIN *et al.*, 2009) apresentando ainda, os sinais comportamentais sugestivos de cio, porém,

mais acentuados com a vulva flácida e edemaciada, confirmando ser uma fase

estral viável para realização da técnica de IA (Fig. 1).

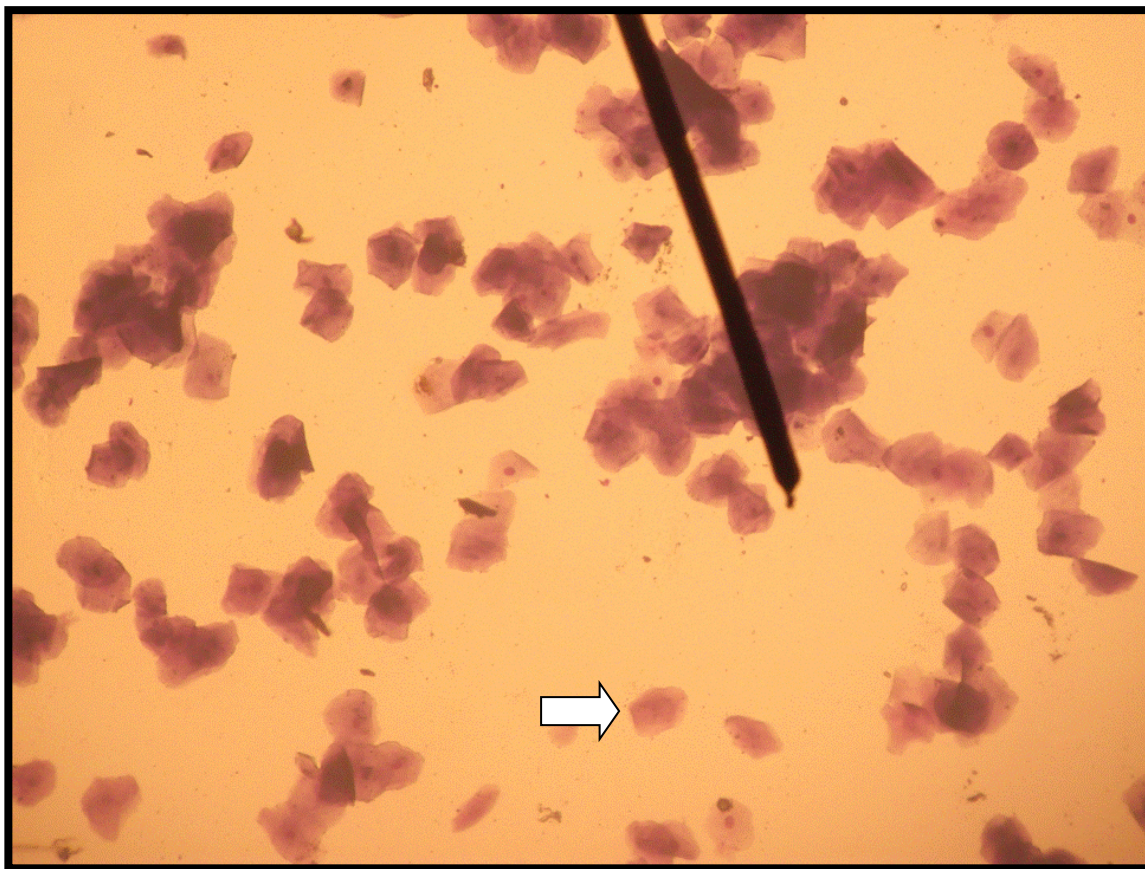


Fig.1. Imagem fotográfica do segundo exame de citologia vaginal observa-se células superficiais anucleadas (seta), correspondendo à fase de estro.

O doador do sêmen, um macho da mesma raça e proveniente do mesmo canil foi submetido a exame clínico e físico, imunoprofilaxia vacinal canídea (vacina polivalente), observação do escore corporal, histórico reprodutivo e do ambiente domiciliar e ainda antecedentes genéticos (outros cruzamentos com sucesso). No exame andrológico realizou-se a inspeção visual com observação e toque da bolsa escrotal e testículos.

Para a colheita do sêmen utilizou-se a fêmea em cio como estímulo visual e olfatório, despertando assim a libido do

mesmo. Após exposição peniana, realizou-se uma leve tração do mesmo e estimulou-se a região caudal ao bulbo com leves pressões digitais (Fig. 2). A colheita seminal foi realizada segundo técnica modificada, descrita por Sánchez (2009). O sêmen *a fresco* foi colhido dentro de uma seringa estéril de 10ml para facilitar o processo de deposição no trato genital feminino, na quantidade total de 5ml (Fig. 2).

Para realização da IA, introduziu-se a pipeta artificial descartável, Provar® tamanho médio, por via vaginal (Fig. 3),

suspendendo a fêmea pela região pélvica, através dos membros pélvicos, em direção dorsal, na posição carrinho de mão.

Acoplou-se a seringa contendo o sêmen na pipeta e injetou-se no vestibulo vaginal.

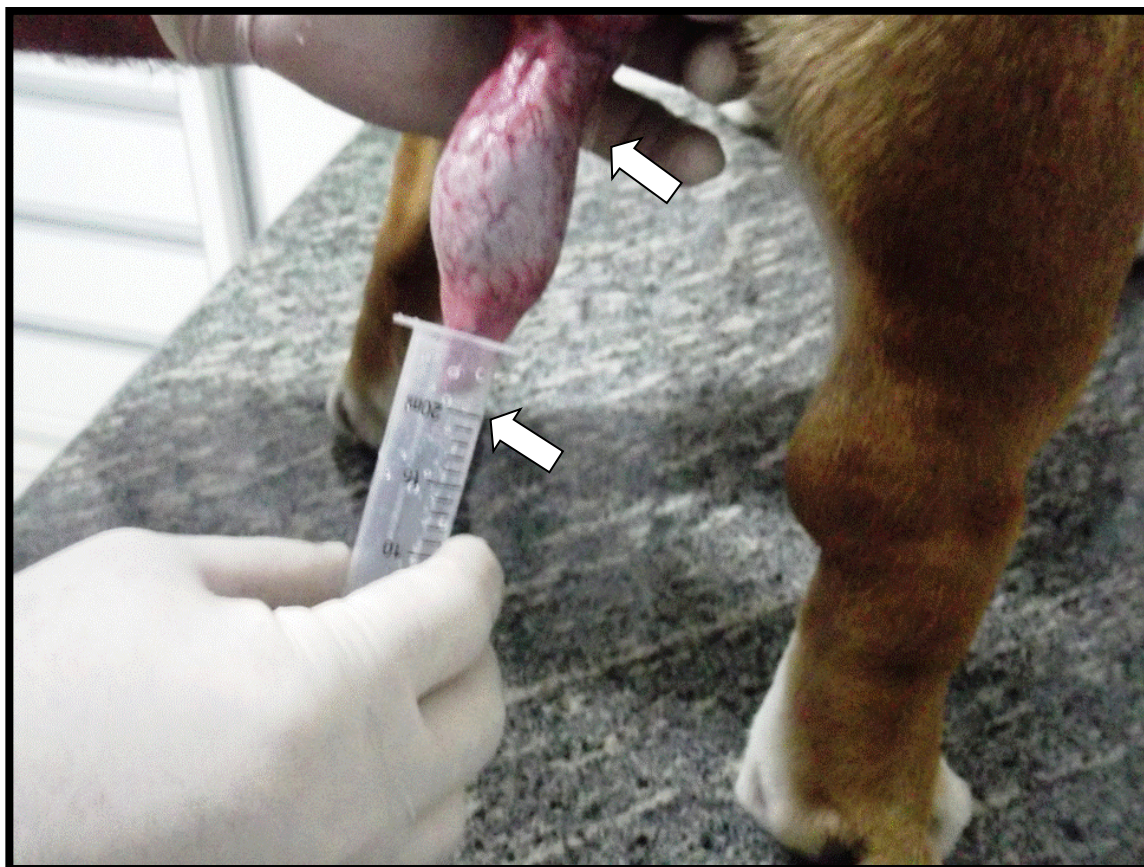


Fig 2. Acondicionamento de sêmen no momento da colheita com fricção manual peniana em seringa estéril de 10ml (seta).

A fêmea permaneceu nessa posição por um período aproximado de cinco minutos para que por meio da gravidade o sêmen fosse depositado de forma adequada e evitando assim que ocorresse refluxo (SÁNCHEZ, 2009). Após a deposição do sêmen introduziu-se o dedo indicador via vaginal para que a fêmea efetuasse

contrações vulvares impedindo o refluxo do sêmen.

Para obter segurança na metodologia, optou-se por realizar três sessões de inseminações, com uma aplicação de sêmen ao dia, em dias alternados (JACOMINI *et al.*, 2006).



Fig. 3. Introdução de uma pipeta de inseminação PROVAR® na região do vestibulo vaginal contendo sêmen *a fresco* (seta).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fêmea da raça Bulldog Inglês atendida apresentava cios regulares em média a cada seis meses, verificada num período de 12 meses. No ato da anamnese percebeu-se variação comportamental da fêmea chamando atenção para poliaquiúria. Segundo Alves *et al.*, (2002) a poliaquiúria indica ligeira elevação de estrógenos na corrente sanguínea, no entanto, não é um sinal que confirma o exato momento da ovulação. Nenhum sinal perceptível na avaliação clínica nem mesmo a receptividade ao macho devem ser

considerados para estimar o dia da ovulação (BICUDO e MAMPRIM, 2010)

A maturação *in vitro* na espécie canídea possui baixas taxas de sucesso, pois os métodos de colheita e de maturação interferem consideravelmente, tal dificuldade torna limitante outras biotécnicas como a fertilização *in vitro* e a criopreservação (APPARÍCIO *et al.*, 2011). Por esse motivo a metodologia empregada para o caso relatado foi a inseminação *a fresco* por demonstrar ser uma técnica viável, prática e com altas taxas de concepção (CORRÊA, 2009).

O sistema reprodutor feminino passa continuamente por alterações relacionadas ao ciclo estral e a identificação do período de maior fertilidade da fêmea é de extrema importância (OLIVEIRA E MARQUES, 2003). Para identificação do ciclo estral da canídea fêmea atendida, realizou-se exame de citologia vaginal, segundo técnica descrita por Stein *et al.*, (2009). Foi introduzido o *swab* em duas etapas devido à necessidade de realizar um exame pareado. O material obtido foi transferido para duas lâminas de microscopia, respectivamente, onde se identificaram células superficiais abundantes com contornos mais alinhados, células anucleadas e diminuição na quantidade dos eritrócitos (ALMEIDA, 2009). Bicudo e Mamprim, (2010) indicam que a colheita de material para avaliação citológica pode ser efetuada com auxílio de uma escova ginecológica, no entanto, conseguiu-se obter material celular necessário para uma boa avaliação citológica com auxílio de *Swab*.

Na primeira colheita o resultado obtido foi uma quantidade inferior a 80% de células superficiais. Na fase do proestro, são observados numerosos eritrócitos estando a cadela sob ação estrogênica no endométrio, onde há diapedese de eritrócitos para o epitélio vaginal devido ao

aumento da vascularização. Nessa fase, será observada também uma leve quantidade de neutrófilos, células parabasais e intermediárias e, de forma moderada, células superficiais. Com o avançar do proestro, há presença de células superficiais com núcleo picnótico e leve quantidade de células anucleadas não cornificadas, o que mostra a transição para fase do estro, conforme (HENSON, 2003).

Na segunda avaliação citológica o resultado obtido foi uma quantidade superior a 80% das células superficiais, correspondendo à fase de estro (ALVES *et al.*, 2002), sendo portanto, indicativo de fase de fertilidade. Na fase do estro, verifica-se o predomínio de 95% de células superficiais anucleadas cornificadas, além de leve número de células intermediárias grandes, o que condiz com (ALLISON *et al.*, 2008). Na fase de diestro, são observadas intensa quantidade de neutrófilos, bactérias e células intermediárias pequenas e leve quantidade de células parabasais. Em alguns campos, é possível a visualização de bactérias fagocitadas por neutrófilos, mostrando que nessa fase há um processo de eliminação de patógenos advindos da cópula (HENSON, 2003).

O doador de sêmen, proveniente do mesmo canil foi submetido a exame clínico e físico e exame andrológico (CUNHA,

2008). Não indica-se a colheita de sêmen sem a avaliação da cor, volume, motilidade e vigor (CUNHA, 2008), no entanto, para este caso não se realizou avaliação espermática devido à fertilidade positiva do macho em outras fêmeas e também a não concordância do exame pelo proprietário do animal.

É um grande erro direcionar os problemas reprodutivos somente ao macho, é necessário que se acompanhe todo o processo desde a realização da IA ou monta natural até o nascimento dos filhotes para que se possa identificar se os pacientes são férteis ou não (SPINATO, 2012).

A IA na raça Bulldog tem como justificativa a dificuldade da realização da monta natural, a baixa taxa de prenhez e número reduzido de filhotes (JACOMINI *et al.*, 2006). Desta forma muitos proprietários com o intuito comercial procuram profissionais que realizem tais práticas reprodutivas. A IA, efetuada na fêmea foi realizada segundo técnica modificada descrita por Sánchez (2009). Pode ser utilizada uma bacia de transferência de embriões seccionada ao meio com o mesmo intuito da pipeta descartável nas inseminações intra-vaginais (JACOMINI *et al.*, 2006). O

protocolo estabelecido quanto as datas de inseminação foram baseadas em protocolos (JACOMINI *et al.*, 2006) onde realizaram-se três sessões de inseminações, com uma aplicação de sêmen ao dia, em dias alternados, devida a viabilidade do sêmen, pois este permanece viável no trato reprodutivo da fêmea por longos períodos, não necessitando submeter a fêmea a manejos e condições estressantes.

A dose de sêmen utilizada para a inseminação na paciente não foi padronizada, sendo assim, todo o conteúdo possível colhido era transferido para o trato reprodutivo da fêmea. Cerca de 3ml de sêmen são suficientes para a inseminação intravaginal, obtendo um índice de 75% de prenhez com média de 6,17 filhotes utilizando sêmen fresco e técnica de IA intra-vaginal. Na técnica realizada neste relato preconizou-se colher no mínimo 5ml (JACOMINI *et al.*, 2006; CORRÊA, 2009)

Para a confirmação da gestação realizou-se exame ultrassonográfico 27 dias após o início do protocolo de IA e por meio deste confirmou-se o sucesso da técnica pela boa evolução gestacional. Durante a realização do exame por imagem estimou-se uma média de cinco filhotes (Fig. 4).



Fig. 4. Imagem do exame ultrassonográfica da paciente Bulldog Inglês, realizado 27 dias após o início do protocolo de inseminação artificial, confirmando diagnóstico de gestação (setas) .

Torna-se importante ressaltar que a não ocorrência da gestação é um fator extremamente preocupante quando se trata de fêmeas destinadas à reprodução, já que as mesmas permanecem por um período limitado nessa atividade e consequentemente ocorre uma redução nas oportunidades de concepção e parição. Os problemas relacionados às falhas reprodutivas geram perdas financeiras elevadas. Muitas vezes as falhas podem ser direcionadas a falta de prática do profissional ou falta de avaliação citológica para detecção da época viável para inseminação (SPINATO, 2012).

O criador da raça Bulldog Inglês foi orientado pelo corpo clínico quanto ao manejo reprodutivo, nutricional e sanitário, buscando zelar pela saúde e bem estar de seus animais (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Para muitas pessoas a área da reprodução de cães e gatos é voltada apenas para atender o capricho dos proprietários e torna-se importante ressaltar que os procedimentos relacionados à reprodução desses animais é uma forma de manter e preservar essas espécies.

As raças braquicefálicas normalmente apresentam altas taxas de distocias (LUZ *et al.*, 2005). No caso

descrito, o animal era braquicefálico e sua raça com histórico de distocia, portanto, sugeriu-se a realização de procedimento cirúrgico de cesariana sendo esta marcada previamente. A gestação desenvolveu-se tranquila e sem transtornos e assim,

transcorridos 57 dias ao protocolo de inseminação, realizou-se o procedimento cirúrgico com histerorrafia que resultou no nascimento de sete filhotes, porém um destes foi a óbito minutos após o procedimento (Fig.5).



Fig. 5. Imagem fotográfica da fêmea, Bulldog Inglês submetida ao protocolo de Inseminação Artificial e seus filhotes, concebidos deste procedimento por intermédio de cesariana.

CONCLUSÃO

A citologia vaginal demonstrou que é uma técnica eficiente na classificação da fase do ciclo estral, auxiliando o clínico veterinário na sua conduta terapêutica. Essa técnica foi de fácil realização, de baixo custo, indolor, não invasiva ao animal e que forneceu um diagnóstico

rápido no que diz respeito à reprodução de cadelas. Concluiu-se que a técnica descrita utilizando sêmen *a fresco* é de fácil aplicabilidade e alta viabilidade. Os métodos utilizados para avaliar os parâmetros comportamentais e reprodutivos foram eficazes para determinar o período de inseminação artificial. A quantidade de sêmen foi

suficiente para uma gestação com boa taxa de prenhez.

REFERÊNCIAS

- ALLISON, R.W.; THRALL, M.A.; OLSON, P.N. Vaginal cytology. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DeNICOLA, D.B. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat**. 3.ed. Mosby Elsevier, Missouri. 2008, cap. 25, p. 378-389.
- ALMEIDA, J. M. **Embriologia Veterinária Comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, p. 12-13.
- ALVES, I. MATEUS, M.; LOPES DA COSTA, L. Monitorização do ciclo estrico da cadela para inseminação artificial ou cruzamento. In: **Congresso de Ciências Veterinárias [Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, 2002]**, SPCV, Oeiras, p. 177-182, Out. 2002.
- APPARÍCIO, M.; MOSTACHIO, G.Q.; MOTHEO, T.F.; PADILHA, L.; ALVES, A.E.; PIRES-BUTLER, E.A.; VICENTE, W.R.R. Maturação *in vitro* de oócitos canídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.16-25, jan./mar. 2011.
- ASBIA. **Relatório Estatístico de Importação, Exportação e Comercialização de Sêmen**. 2010.
- BICUDO, L.A.C.; MAMPRIM, M.J. Avaliação Ultra-sonográfica convencional e dopplerfluxométrica durante a fase folicular do ciclo estral de cadela. **Veterinária e Zootecnia**, n.4, v.17, p. 507-518. Dez. 2010.
- BUENO, R. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento**. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária para obtenção de título de “Magister Scientiae”. 2000.
- CARDOSO, R. C. S. Infertilidade na cadela e na gata. **Ciência Animal**. Edição especial, v. 22, n.1, p. 235-247, 2012.
- CHIRINÉA, V. H. **Inseminação artificial com sêmen congelado em cães**. Tese apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal. 2008.
- CORRÊA, S. M. F. **Refrigeração de sêmen canino em caixa térmica comercial**. Dissertação apresentada à Universidade de Franca, UNIFRAN, como exigência parcial, para a obtenção do título de mestre em Cirurgia e Anestesiologia Veterinária. 2009.
- COSTA, T.I.R. **Urgências reprodutivas na cadela**. Dissertação apresentada à Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, como exigência parcial, para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária. 2010.
- CUNHA, I. C. N. Exame andrológico do cão. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal** v. 1, n. 1, p. 49-65. 2008.
- DERUSSI, P. A. A.; LOPES, D. M. Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n°. 4 p. 231-237. Out./ Dez. 2009.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 47, p.243-55, 1993.
- ENGLAND, G. C. W.; PÖNZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v. 46, p. 165-171, 1996.
- GRADELA, A.; HORNOS, T. Aumento de neutrófilos no diestro gestacional associado com eventos pré e durante implantação embrionária em cadelas. **Veterinária em Foco**, Canoas, v.6, n°.1, p. 51-62. Jul/ dez 2008.
- GONÇALVES, P. B. D; DE FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. 2 ed. São Paulo: Rocca, 2008.p11-12.

- HENSON, K.L. Sistema reprodutor. In: RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003, cap. 11, 233-263p.
- JACOMINI, J.O.; MOREIRA, C.F.; CUNHA, G.N. Uso da inseminação artificial como rotina em programas de reprodução de cadelas da raça Bulldog. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 12, n. 2, p. 139, set. 2006.
- LANNA, L.L., MASCARENHAS, R.M., MARQUES JÚNIOR, A.P. Abordagem clínica da infertilidade na cadela e patologias associadas: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.36, n. 2, p.113-121, abr./jun.2012.
- LEÃO, M. K. **Técnicas de inseminação artificial**. Monografia realizada durante a disciplina Seminários II do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu. 2003.
- LUZ, M. R.; FREITAS, P. M. C., PEREIRA, E. Z. Gestação e parto em cadelas: fisiologia, diagnóstico de gestação e tratamento das distocias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.3/4, p.142-150, 200 jul./dez. 2005.
- MACEDO, S. P. **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. 2009.
- MENDONÇA, R. A. B. **Características de sêmen canino refrigerado - comparação entre três diluidores diferentes**. Universidade Técnica De Lisboa Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa. 2010.
- NEULS, G. M. **Efeito da curva de refrigeração na qualidade do sêmen canino**. Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias na área de Biotécnicas de Reprodução Animal. 2007.
- NOVAES, P. A.; BISCEGLI, I. C. Novo sistema de micromanipulação. **Circular Técnica**, v. 6, p.97.1997.
- OETTLÉ, E. E. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. **Animal Reproduction Science**, v. 12, p. 145-150, 1986.
- OLIVEIRA, E C.S., MARQUES JR, A.P. Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v.8, n.1, p. 1-12, 2003.
- RIBEIRO, A.P.C.; PIRES, E.A.; APPARÍCIO, M.; ALVES, A.E.; CARARETO, R.; VICENTE, W.R.R. Maturação *in vitro* de oócitos canídeos: aspectos fisiológicos e sua relação com a evolução da técnica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 1, v. 34, p. 50-57. Jan/ mar, 2010.
- ROCHA, A. A. Maturação *in vitro* de oócitos de cadelas domésticas: efeitos na qualidade oocitária e presença espermática na maturação *in vitro*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p. 267-284. 2007.
- ROMAGNOLI, S. Canine artificial insemination with fresh, refrigerated and frozen semen. **Congresso de Ciências Veterinárias Congresso de Ciências Veterinárias [Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, 2002]**, SPCV, Oeiras, p. 167-170, out 2002.
- SCHÄFER-SOMI, S.; KOWALEWSKI, M.P.; KANCA, H.; BOZKURT, M.F.; GRAM, A.; SABITZER, S.; KUCUKASLAN, I; AY, S.S.; ASLAN, S. GnRH and its receptor (GnRH-R) are expressed in the canine placenta and uterus. *Theriogenology*. n.84, v.9, P. 1482-1489. Dez. 2015.
- SÁNCHEZ, J, A, Á. **Principales técnicas de inseminacion artificial em canis familiaris**. Tesi para obtener título de médico veterinario zootecnista. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 2009.

SERAFIM, B, K, M. **Cultivo de folículos pré-antrais canídeos em diferentes concentrações de hormônio folículo estimulante**. Monografia realizada durante a disciplina Seminários II do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária. Área de Concentração em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu. 2009.

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

SILVA, A. R.; R. C. S. CARDOSO; SILVA, L. D. M. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canídea. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.98, n.546, p. 53-60. 2003.

STEIN, M. Avaliação da microbiota vaginal de fêmeas caníneas relacionadas com o ciclo estral. **XVIII CIC, XI ENPOS, I Mostra Científica**. 2009.

SPINATTO, D. **Ipfertilità Nel Cane Maschio**. Tesi di laurea. Corso di laurea specialistica a ciclo unico in Medicina Veterinaria Dipartimento di Medicina Animale Reproduzioni e Salute. 2012.

STORNELLI, M. A., STORNELLI, M., DE LA SOTA, R. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. aplicación y desarrollo en caninos. **Analecta Veterinaria**, v. 21, p. 58- 66, 2001.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K; **Consulta veterinária em 5 minutos: espécies caníneas e felinas**. 3ªed.: Barueri: Manole, 2008.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in cryopreservation of sperm and assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-892, 1995.