

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS

CENTRO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

BÁRBARA BARROS MARTINELLI

**PARTICULARIDADES DO CICLO ESTRAL E INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM CADELAS**

CAMPINAS 2020

BÁRBARA BARROS MARTINELLI

**PARTICULARIDADES DO CICLO ESTRAL E INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM CADELAS**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado como exigência para
obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária na Pontifícia
Universidade Católica de Campinas.

Orientadora: Prof. Danielle Cristinne
Baccarelli

PUC-CAMPINAS

2020

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca da PUC Campinas

Martinelli, Bárbara Barros

Particularidades do ciclo estral e inseminação artificial em cadelas / Bárbara Barros Martinelli. - Campinas: PUC-Campinas, 2020.

50 f.: il.

Orientador: Danielle Cristinne Bacarelli.

TCC (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Centro de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas,

2020. **FOLHA DE APROVAÇÃO**

1. Inseminação artificial . 2. Citologia vaginal. 3. Controle do ciclo estral. I. Bac arelli, Danielle Cristinne . II. Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Centro de Ciências da
da ÉRIKA RIBEIRO DA SILVA Vida. Faculdade de Medicina Veterinária. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

BÁRBARA BARROS MARTINELLI

PARTICULARIDADES DO CICLO ESTRAL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM CADELAS

Trabalho de Conclusão de Curso
aprovado como requisito para obtenção
do grau de Bacharel no Curso de
Graduação em Medicina Veterinária,
Faculdade de Medicina Veterinária,
Pontifícia Universidade Católica de
Campinas – PUC-Campinas, pela banca
examinadora:

Professor(a)-Orientador(a): _____

Prof. Danielle Cristinne Baccarelli
Faculdade de Medicina Veterinária
PUC-Campinas

Membro: _____

Prof. Bruna Marcele Martins de Oliveira
Faculdade de Medicina Veterinária
PUC-Campinas

Membro: _____

Prof. Marta Maria Circhia Pinto Luppi
Faculdade de Medicina Veterinária
PUC-Campinas

Campinas

2020

Dedico esse trabalho aos meus pais, namorado, amigos e professores que me ajudaram e me apoiaram tanto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me ajudou a chegar até aqui.

Aos meus pais que sempre acreditaram nos meus sonhos e batalharam muito para eu realizar um deles, que é ser Médica Veterinária. Eles que aguentaram cada choro e mau humor, me apoiaram, me proporcionaram morar em Campinas para facilitar meus estudos e estiveram sempre presentes na minha vida, comemorando cada vitória e lutando em cada derrota. Principalmente neste momento tão especial para mim, sou eternamente grata a vocês.

Ao meu namorado que me ajudou a procurar artigos, teve toda a paciência do mundo principalmente nessa reta final, acalmou-me quando eu achava que nada ia dar certo e me apoia em cada decisão mesmo quando essas são muito difíceis. Amo você.

Aos meus amigos que escutaram minhas reclamações, dificuldades e angústias, que me mostraram que a amizade vai além da sala de aula e que passaram por essa junto comigo. Obrigada por tornarem os meus dias ainda melhores, Thafnys Ramos, Isabela Benfica, Isabela Miranda. Em especial a uma amiga das antigas, Nathalia, que teve uma paciência enorme para tirar minhas dúvidas, deixou de fazer as suas coisas para fazer videoconferência comigo e me deu o maior apoio, obrigada. Amo vocês.

E por último, mas não menos importante queria agradecer á minha orientadora Danielle Cristinne Baccarelli por toda paciência e dedicação, e aos meus professores em especial a Marta Luppi, Paulo Griska, Bruna Marcele e Michele Barros, que além de terem me ensinado tudo o que eu aprendi, ensinaram-me a me apaixonar ainda mais pela profissão que eu escolhi. Obrigada a todos por toda dedicação e esforço de cada um.

“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento”
Frederick Herzberg

RESUMO

A inseminação artificial em cadelas é um procedimento cada vez mais procurado pelos criadores e tutores, com o objetivo de manter boas características genéticas de determinada raça. As pesquisas mostram resultados muito positivos para tal técnica, principalmente utilizando-se inseminação via intravaginal e sêmen congelado fresco. Outro fator que auxilia na maior precisão para realizar o procedimento é a detecção do estro, pois a espécie canina possui uma fisiologia reprodutiva particular. Para isso, o método de citologia vaginal é o mais utilizado, mas também se pode empregar a dosagem plasmática/fluido de progesterona (via sangue ou saliva) e a ultrassonografia (normal ou Doppler). Ainda em se tratando do ciclo estral, existem fármacos que controlam o ciclo induzindo o estro, como ECG/HCG, além dos exames de identificação para que a inseminação artificial seja feita no dia correto, aumentando, assim, a taxa de sucesso desse procedimento. As desvantagens desse procedimento podem incluir inflamação e/ou infecção ascendente por microrganismos que habitam normalmente o trato genital inferior; técnicas incorretas; e até materiais não esterilizados, por isso é muito importante ser um médico veterinário especializado na técnica.

Palavras-chave: Inseminação artificial. Citologia vaginal. Controle do ciclo estral

ABSTRACT

Artificial insemination in bitches is a procedure that is increasingly sought by breeders and guardians, with the aim of maintaining good genetic characteristics of a certain breed. Research shows very positive results for this technique, mainly using insemination via intravaginal and fresh frozen semen. Another factor that helps with greater precision to perform the procedure is the detection of estrus, as the canine species has a particular reproductive physiology. For this, the

vaginal cytology method is the most used, but plasma dosage / progesterone fluid (via blood or saliva) and ultrasound (normal or Doppler) can also be used. Also, when it comes to the estrous cycle, there are drugs that control the cycle by inducing estrus, such as ECG / HCG, in addition to identification tests so that artificial insemination is done on the correct day, thus increasing the success rate of this procedure. The disadvantages of this procedure can include inflammation and / or ascending infection by microorganisms that normally inhabit the lower genital tract; incorrect techniques; and even non-sterile materials, so it is very important to be a veterinarian specialized in the technique.

Keywords: Artificial insemination. Vaginal cytology. Control of estrous cycle

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Imagem 1- Órgãos genitais feminino das cadelas (representação esquemática)

Imagem 2- Citologia vaginal da cadela ao longo do ciclo éstrico, ampliação 40x

Imagem 3- Ovário de uma cadela com presença de corpos lúteos

Imagem 4- Fotomicrografia de citologia vaginal corada por panótico rápido

Imagem 5- Ultrassonografia do ovário da fêmea

Imagem 6- Técnica de IAIV

Imagem 7- Cateter de Osiris

Imagem 8- Cateter Mavic

Imagem 9- Palheta convencional de 0,5 ml

SIGLAS E ABREVIações

| | |
|-----------------------|---|
| IA | Inseminação artificial |
| IAIU | Inseminação artificial intrauterina |
| IAIV | Inseminação artificial intravaginal |
| FSH | Hormônio folículo estimulante |
| LH | Hormônio luteinizante |
| ng/ml | Nanogramas por mililitro |
| eCG/hCG humana | Gonadotrofina coriônica equina/ Gonadotrofina coriônica humana |
| UI/ kg | Unidade internacional |
| Ug/kg | Unidade de massa igual a um milionésimo de grama |

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 2 |
| REVISÃO DE LITERAURA | 15 |
| 2.1 SISTEMA REPRODUTOR FEMININO | 16 |
| 2.1.1 Anatomia..... | 16 |
| 2.1.2 Fisiologia | 17 |
| 2.1.2.1 Ovogenese (oogenese) | 17 |
| 2.1.2.2 Ovulação | 18 |
| 2.2 CICLO ESTRAL | 18 |
| 2.2.1 Controle do ciclo | 20 |
| 2.2.1.1 Drogas para indução do estro | 20 |
| 2.2.1.2 Drogas empregadas para a supressão do estro | 21 |
| 2.3 EXAMES DE IDENTIFICAÇÃO | 21 |
| 2.3.1 Citologia vaginal | 22 |
| 2.3.2 Ultrassonografias | 23 |
| 2.3.2.1 Emprego da ultrassonografia Doppler para avaliação das artérias uterinas e ovariana | 24 |
| 2.3.2.2 Ultrassonografia convencional | 24 |
| 2.3.3 Dosagens plasmática de progesterona | 25 |
| 2.3.4 Mensurações da progesterona salivar | 25 |
| 2.4 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM CADELAS | 27 |
| 2.5 Vias de inseminação | 27 |
| 2.5.1 Inseminação artificial intravaginal (IAIV) | 27 |
| 2.5.2 Inseminação artificial intrauterina (IAIU) | 29 |
| 2.6 Técnicas de inseminação artificial | 30 |
| 2.6.1 Inseminação artificial com sêmen fresco | 30 |
| 2.6.2 Inseminação artificial com sêmen congelado | 31 |
| 2.6.3 Inseminação artificial com sêmen refrigerado | 31 |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| 2.7 Desvantagens da IA | 32 |
| 2.8 Resultados da IA | 32 |
| 3 CONCLUSÃO | 34 |
| 4 REFERÊNCIAS | 36 |
| | |

1. INTRODUÇÃO

Os animais domésticos como o cão, vêm ganhando cada vez mais importância para o homem. Em decorrência disso os esforços para obter animais com alto valor genético são maiores, surgindo assim a necessidade de utilização das técnicas de reprodução, como as técnicas de inseminação artificial (IA), para preservar o material genético de reprodutores de alto valor.

Por muitos anos, as pesquisas relacionadas às técnicas eram restritas apenas aos animais de produção, porém, na década de 1990 a comunidade científica passou a estudar a espécie canídea, como forma de preservar a biodiversidade animal (RIBEIRO et al., 2010).

Em comparação com os últimos 20 anos, hoje os veterinários são mais frequentemente solicitados para resolver os problemas de fertilidade do cão e do gato, principalmente devido ao aumento da popularidade dos cães de raça pura, bem como dos sentimentos ou razões financeiras relacionadas a esses animais (FONTBONNE, 2011).

Existem diversos relatos sobre como se originou a IA. A mais conhecida é a lenda de um árabe que colheu o sêmen de um garanhão com o auxílio de um algodão e posteriormente introduziu na genitália de uma égua em cio, resultando no nascimento de um potro. Tempos depois coube ao monge Lazzaro Spallanzia (em 1780) realizar a colheita de um cão para inseminar uma cadela.

Entre as inúmeras técnicas desenvolvidas para o melhoramento genético de animais, a IA ocupa uma posição importante (JAIN, 2015).

A técnica de IA é muito utilizada em espécies como, bovinos, equinos, caprinos, suínos e canídeos, com o objetivo obter descendentes de progenitores subférteis ou com alguma incapacidade de realizar a cobertura. Os resultados na maioria das vezes, são satisfatórios. Devido às impossibilidades da realização da cópula, a IA utiliza sêmen fresco, resfriado ou congelado e estes podem ser introduzidos pela via intravaginal ou intrauterina.

Para termos sucesso na IA, precisamos identificar o período exato em que ocorre a ovulação. A cadela é uma espécie que possui diferenças na sua fisiologia reprodutiva, quando comparada com as outras fêmeas, por isso é

necessária a identificação do cio por meio de técnicas como, citologia vaginal, ultrassonografia e dosagem plasmática de progesterona.

16

O objetivo deste trabalho é demonstrar (i) as principais particularidades da fisiologia reprodutiva; (ii) os métodos de identificação do estro; (iii) os principais métodos; (iv) as desvantagens e (v) os resultados da IA nas fêmeas caninas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema reprodutor das fêmeas

2.1.1 Anatomia

Segundo Dyce (2010) os ovários são comumente encontrados na parte dorsal do abdômen, adjacente às extremidades dos corpos uterinos. Cada ovário fica suspenso no interior da parte cranial (mesovário) do ligamento largo. As funções dos ovários são gametogênicas e endócrinas.

O ovário das cadelas possui formato elipsoide de superfície caracterizada por folículos e corpos lúteos grandes, medindo cerca de 1 a 1,5 cm (KONIG; LIEBICH 2014).

Já as tubas uterinas (também denominadas ovidutos) são um par de tubos envolvidos que levam o ovócito de cada ovário para o respectivo corno do útero, constituindo o lugar habitual da fertilização dos ovócitos pelos espermatozoides (FRANDSON et al, 2011).

O útero é a parte do trato reprodutivo que exhibe as maiores diferenças espécie-específicas. É onde os embriões se alojam e criam meios para as trocas fisiológicas com a corrente sanguínea materna (DYCE, 2010).

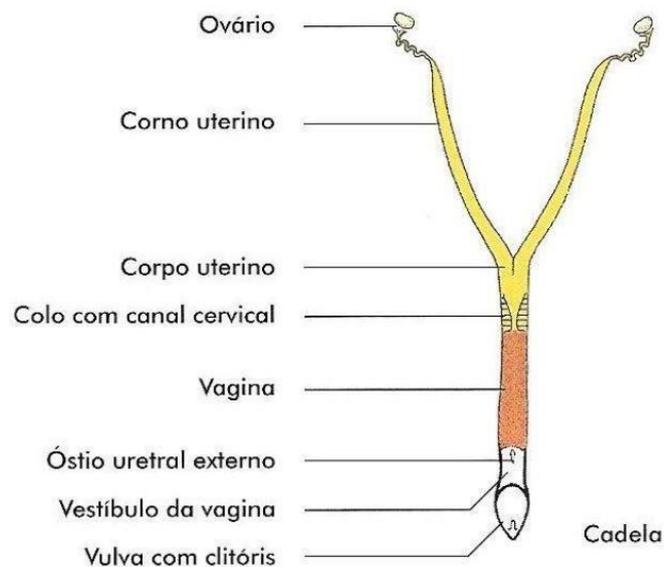
A anatomia do útero varia consideravelmente de acordo com a sua idade e a atividade fisiológica. Nas cadelas, ele se posiciona principalmente dorsal ao intestino delgado. Esse se resume a um colo e um corpo curto dos quais se projetam dois cornos delgados e longos, opostos, que alcançam os ovários no sentido caudal aos rins, como descrito por König e Liebich (2014).

Dyce (2010) descrevem que a vagina apresenta duas partes: cranial, que é simplesmente uma passagem reprodutiva, partindo da cérvix até a entrada da uretra; e a parte caudal, o vestíbulo, que se estende do óstio uretral até a vulva, relacionando funções urinárias e reprodutivas. O órgão copulatório da fêmea e o canal do parto são formados por essas duas partes.

O vestíbulo, que é menor do que a vagina encontra-se principalmente caudal ao arco isquiático, condição que lhe permite inclinar-se ventralmente a sua abertura na vulva. Essa abertura é restrita pelos lábios que se encontram nas junções dorsal e ventral (DYCE, 2010).

O coito e o parto são facilitados, pois, a parede do vestibulo apresenta glândulas vestibulares, cuja secreção preserva a umidade da mucosa do vestibulo (KONIG; LIEBICH, 2014), como apresentado na figura 1 a seguir.

Imagem 1 - Órgãos genitais feminino das cadelas (representação esquemática)



Fonte: KONIG; LIEBICH (2014) Legenda: Representação esquemática das particularidades do órgão reprodutor feminino das cadelas.

2.1.2 Fisiologia

Comparando as cadelas com outras espécies, estas apresentam características da fisiologia reprodutiva incomuns, como longa duração de proestro e estro; longo período pré-implantação; ovulação de oócitos em estágio imaturo; e transporte lento para tuba uterina (de nove a doze dias) conforme apontam Reynaud et al, (2005).

2.1.2.1 Ovogênese (oogênese)

Como descrito por Derussi e Lopes (2009) a oogênese é definida pela formação de oócitos pelas células germinativas primordiais (oogônias) e pela proliferação mitótica de células epiteliais internas, originadas de uma interação de diversos tipos celulares, ainda na fase pré-natal.

Ovogônia (oogônia) é conhecida como célula germinativa central, aumenta e inicia a meiose, mas não a completa, e para na primeira fase-prófase,

antes da primeira divisão. Neste estágio, o oócito primário é um ovócito em desenvolvimento, enquanto a combinação de um oócito primário com sua camada de célula folicular cuboide circundante constitui um folículo primário (FRANDSON et al, 2011).

Ao nascerem, os ovários da maioria das espécies domésticas possuem centenas de milhares de folículos primários à espera do avanço de seu desenvolvimento. Não se sabe ao certo o que determina qual dos folículos primários será selecionado para desenvolver-se em cada ciclo estral subsequente (FRANDSON et al, 2011).

2.1.2.2 Ovulação

Em geral, momentos antes da ovulação, os ovócitos já maduros estão circundados pela zona pelúcida, corona radiata, uma camada de células da granulosa que reveste o antro e o óforo (camada de células da granulosa que se separou e que não reveste mais o antro), segundo Frandson et al, (2011).

O ovócito primário, que se mantém em repouso em relação à meiose durante o desenvolvimento folicular, sofre a primeira divisão meiótica para produzir um ovócito secundário e o primeiro corpúsculo polar na maioria das espécies, logo antes da ovulação. Já o primeiro corpúsculo polar é expelido do ovário junto com o ovócito secundário (FRANDSON et.al, 2011).

A secreção do hormônio FSH (hormônio folículo estimulante) e a onda pré-ovulatória do LH (hormônio luteinizante) estão intimamente ligadas à ocorrência da ovulação (REYNAUD et al, 2005).

A ovulação ocorre cerca de 48h após o pico de LH e dura menos de 24 horas, por essa razão, o período fértil da cadela situa-se entre os dias 2 e 5 após a ovulação (ALVES; MATEUS; LOPES DA COSTA, 2002).

2.2 Ciclo estral

A cadela é uma espécie monoéstrica, não estacional, com proestro/estro com duração de duas a três semanas. Apresentando ovulação espontânea, seguida de uma fase luteal que dura por volta de 65 dias quando gestante, ou um pouco mais quando não gestante. Após essa fase segue-se o anestro obrigatório (SILVA, 2016). Os intervalos entre os estros podem variar de 5 a 12 meses (CONCANNON, 2011).

O ciclo reprodutivo da cadela é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e é caracterizado por alterações fisiológicas, endócrinas e comportamentais observadas no animal (CONCANNON, 2011).

O ciclo estral canino compreende fases sucessivas e recorrentes, que variam entre quatro e cinco, dependendo dos autores. Segundo Silva e Lima, são elas: proestro, estro, metaestro/diestro e anestro (imagem 2).

A primeira fase, o proestro dura em média nove dias, podendo variar tanto para, mais quanto para menos. É caracterizado por: edema da vulva, aumento do turgor; proliferação do epitélio em esfregaços vaginais (resultante de queratinização celular); e secreção vaginal, esta responsável por atrair os machos (JEFFCOATE; LINDSAY,1988).

Nas fêmeas, os estrógenos circulantes aumentam trinta dias antes do início do proestro, fazendo a cadela apresentar polaquiúria como forma de difundir ferormônios e atrair os machos (CHIRINEA, 2008).

A concentração de estradiol aumenta de 5 a 15 ng/ml no início, para em seguida atingir picos de 40 a 120 ng/ml. O fim do proestro ocorre num período entre a queda desses níveis de estradiol e a véspera do pico de LH (pré-ovulatório) e é caracterizado pelo comportamento receptivo da fêmea.

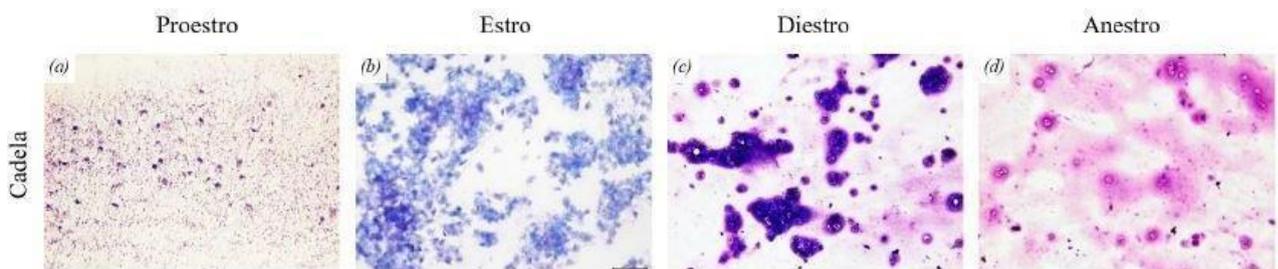
Logo após, o estro dura em média 9 dias, com variações individuais. É caracterizado pela predominância de células epiteliais vaginais queratinizadas na citologia. O estradiol continua a baixar a partir dos valores de pico do proestro final para valores intermediários de 10 a 20 ng/ml. As concentrações de progesterona aumentam rapidamente acima de 1 a 3 ng/ml durante o pico pré-ovulatório de LH, continuam subindo, podendo chegar a 10 a 25 ng/ml. O início do estro é facilitado pelo rápido aumento de progesterona resultante do pico de LH. (CONCANNON, 2011).

Já a fase de metaestro é definida classicamente como período de instalação do corpo lúteo (Imagem 3), porém a cadela não apresenta esse comportamento, por ser uma espécie que possui uma luteinização precoce (ainda na fase de folículo pré ovulatório). Apesar disso a fase de metaestro pode ser caracterizada pela citologia vaginal, devido á presença das células intermediarias ou células parabasais com múltiplos vacúolos citoplasmáticos claros (POST, 1985).

A fase seguinte, do diestro dura em média 75 dias. Nesse período, a progesterona aumenta para picos de 15-80 ng/ml, entre os dias 20 e 35 do ciclo e começa a baixar lentamente até ficar abaixo de 1ng/ml, entre os dias 55 e 90. Já o estradiol varia de 15 a 30ng/ml com um perfil semelhante ao da progesterona, sendo maior na fase luteal média e após essa fase passa a sofrer um declínio (CONCANNON, 2011; OLIVEIRA; MARQUES, 2003; SILVA, 2018).

A última fase é o anestro. Ele se inicia após a queda de progesterona (demora cerca de sete semanas), ficando abaixo de 1 a 2ng/ml. O anestro dura de 18 a 20 semanas. A mudança é identificada externamente pela mucosa que se encontra mais fina e com capilares visíveis (ficando mais vermelha). A citologia vaginal mostra células parabasais em números variáveis e poucos neutrófilos. O estradiol é variável, mas sempre em torno de 5 a 10 ng/ml. O LH fica baixo. (CONCANNON, 2011; OLIVEIRA; MARQUES, 2003; SILVA, 2018).

Imagem 2 - Citologia vaginal da cadela ao longo do ciclo éstrico, ampliação 40x.



Fonte: CARDOSO, C.F.R (2017) Legenda: Citologia vaginal feita em uma cadela durante todo o seu período éstrico, identificando as células epiteliais em cada fase.

Imagem 3 – Ovário de uma cadela com presença de corpos lúteos



Fonte: OLIVEIRA; MARQUES JUNIOR; NEVES (2003). Legenda: Ovário de uma fêmea na fase de metaestro, em que ocorre o desenvolvimento do corpo lúteo.

2.2.1 Controle do ciclo

Tanto em situações em que se quer induzir o estro, quanto em situações opostas, em que se quer inibir a sua ocorrência, pode-se fazer o controle do ciclo. É indicada a indução do estro em casos como anestro primário, que significa ausência de estro após 24 meses de idade; anestro secundário, quando há ausência de estro após 12 meses do último estro; parição em períodos mais adequados para o criador; obtenção de crias ao longo de todo ano; diminuição do anestro fisiológico e planejamento de inseminação artificial. Para esse controle são utilizados fármacos diversos e a escolha de qual deles usar depende da análise e da indicação específica para cada caso (SILVA, L. 2016).

No entanto, ainda não existe um protocolo em que se tenha êxito total, devido principalmente ao complexo sistema de regulação endócrina da ciclicidade nas cadelas (SILVA, L., 2016). Ao indicar uma terapia hormonal, deve-se sempre considerar a real necessidade, levando em conta os efeitos colaterais, consequências para o potencial reprodutivo e o alto custo (CARDOSO, R., 2014)

2.2.1.1 Drogas para indução do estro

O uso eCG/hCG foi concluído por Stornelli et al (2012) que, administrando 50 UI/kg de eCG combinados sete dias depois com 500 UI de hCG mostrou-se efetivo para induzir o estro normal e fértil em cadelas 164 dias após o estro. A taxa de gestação foi em torno de 80%, com duração de 48 dias no intervalo entre os estros.

No estudo feito por Jurczak et. al (2016), foi comparada a administração de cabergolina (5 ug/kg, via oral, por 21 dias) com a de eCG (20 IU/kg, via subcutânea, por 5 dias), seguida de hCG (500 UI, via subcutânea, no último dia de tratamento). Com a cabergolina houve um intervalo maior entre o início do tratamento e a aparição dos primeiros sinais de proestro. Além disso, as cadelas tratadas com eCG/hCG exibiram formações de cistos ovarianos, algo que não aconteceu com as cadelas tratadas com cabergolina. A conclusão, portanto, foi que, com este fármaco, os ciclos são induzidos de forma mais similar a um ciclo natural.

2.2.1.2 Drogas empregadas para a supressão do estro

Os progestágenos têm como efeito a retroalimentação negativa sobre a liberação de prolactina, podendo diminuir as concentrações de testosterona e estrógeno na circulação. Esses fármacos estão disponíveis comercialmente na forma de comprimido, suspensão oleosa e implantes que permitem uma liberação ao longo de várias semanas ou até meses (SILVA, L., 2016). O acetato de megastrol, o acetato de medroxiprogesterona e a proligestona, são os progestágenos mais utilizados (KUSTRITZ, 2012).

O uso desse hormônio vem sendo repensado devido aos seus efeitos colaterais. Apesar de serem amplamente conhecidos e utilizados, podem causar infecções uterinas, acromegalia, diabetes e aumento do risco de hiperestimulação mamaria com formação de nódulos (CONCANNON, 2011).

2.3 Exames de identificação das fases do ciclo estral

Para um manejo reprodutivo eficiente nas espécies domésticas, é essencial fazer a detecção do estro (CONFORTI et al, 2014). Por ser uma espécie monoéstrica, ou seja, de um ou dois períodos de ovulação anuais, a não detecção do estro, pode representar atrasos de cerca de seis meses na produção de filhotes, até o surgimento de um novo ciclo (CONCANNON; BATISTA 1989).

Os oócitos canídeos são liberados em estágio imaturo, tornando difícil definir 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, dificultando a determinação cronológica do desenvolvimento fetal,

sendo esses fatores necessários para escolha da biotécnica adequada (DERUSSI; LOPES, 2009).

A dosagem de progesterona sérica, a ultrassonografia dos ovários e a citologia vaginal são as medidas de monitoramento da atividade ovariana das cadelas (CONFORTI et al, 2014, GRANDI; VANNUCCHI, 2014).

2.3.1 Citologia vaginal

A ação das concentrações crescentes de estrógeno gera alterações morfológicas na mucosa vaginal e nas células epiteliais. Essa ação estimula a proliferação do epitélio vaginal, que passa de poucas camadas no anestro para uma espessura de 20 a 30 camadas de células até o fim do proestro (ALVES et al, 2002).

As alterações hormonais analisadas durante o ciclo estral têm influência no epitélio vaginal, sendo reconhecidas nos esfregaços vaginais. As células presentes no epitélio vaginal são classificadas em superficiais (anucleadas ou nucleadas), intermediárias e parabasais (SCHUTTE, 1967).

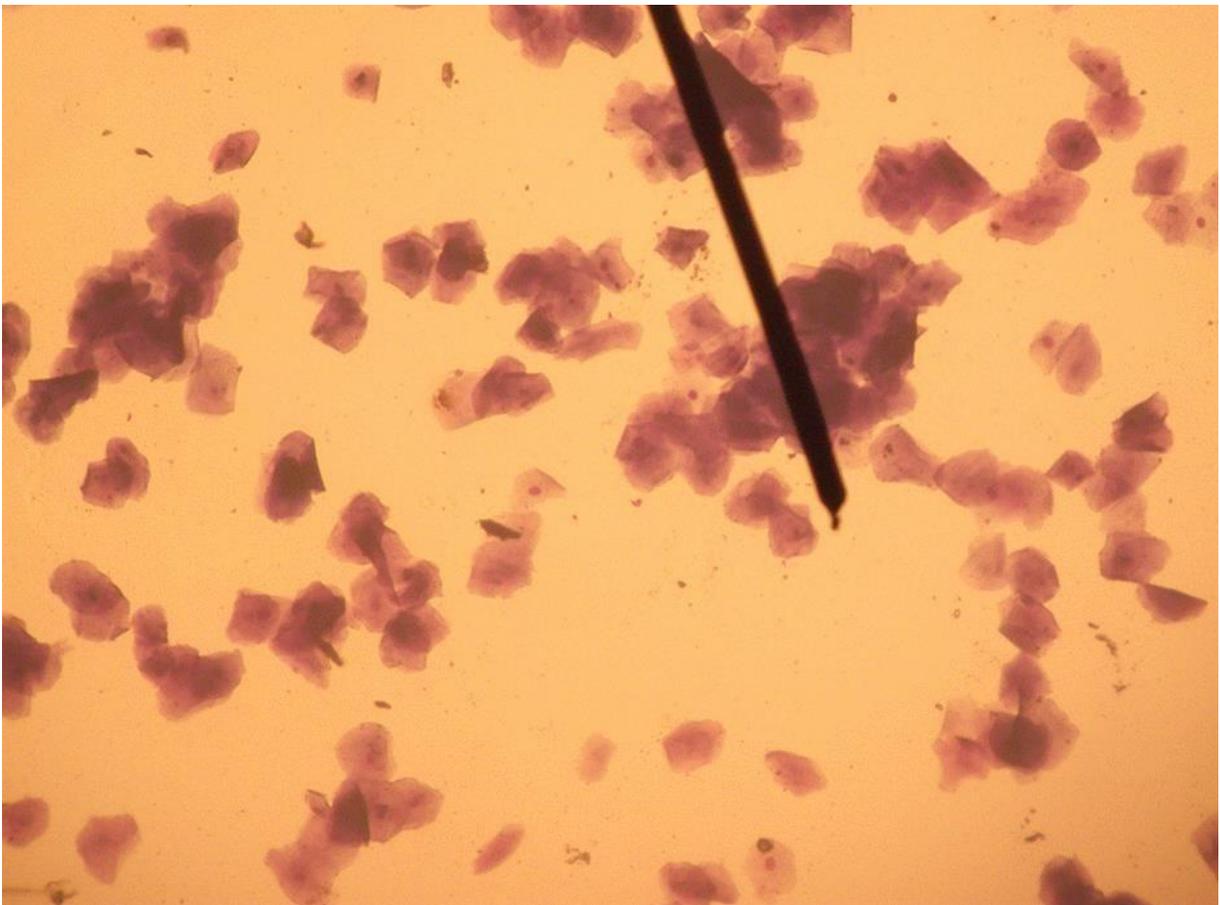
É considerado que a cadela está em estro quando é feita a citologia e no esfregaço celular há um índice de cornificação maior do que 80% (ALVES et al, 2002). Entre o estro e proestro, nota-se uma elevação no número de células superficiais, sendo que as anucleadas atingem sua mais alta porcentagem no estro (KUSTRITZ, 2012).

A coloração dos esfregaços vaginais facilita a determinação da fase do ciclo estral (AYDIN et al, 2011). O panótico rápido utiliza apenas três corantes, e é um método mais rápido de coloração (CONFORTI et al, 2014; GRANDI; VANNUCCHI, 2014).

No estudo feito por Conforti e colaboradores (2014), para avaliar os achados concomitantes de citologia vaginal e ultrassonografia ovariana, os autores confeccionaram semanalmente lâminas de citologia vaginal. As amostras foram coradas pelo método de papanicolau e, por panótico rápido. Foi observada uma tendência de porcentagens mais altas de células superficiais em lâminas coradas pelo primeiro método do que pelo segundo, durante todo o período de alta influência estrogênica. Apesar disso, o método do panótico rápido é uma alternativa ágil para detectar esse período em cadelas.

Já no estudo feito por Vieira e colaboradores (2012), amostras de material vaginal das cadelas foram coletadas, para análise do estágio do ciclo estral. Foram observados numerosos eritrócitos na lâmina, poucos neutrófilos, células basais intermediárias e baixas células superficiais durante a fase de proestro. Já em estro (Imagem 4), verificou-se 95% de células superficiais anucleadas cornificadas, além de um pequeno número de células intermediárias. Na fase diestro foram vistas grandes quantidades de neutrófilos, bactérias e células intermediárias pequenas, bem como baixa quantidade de parabasais. Com esse estudo, foi concluído que a citologia vaginal demonstra ser uma técnica eficiente na classificação da fase do ciclo estral.

Imagem 4 - Fotomicrografia de citologia vaginal corada por panótico rápido



Fonte: KARLING, ROQUE, OLSSON (2017). Legenda: Lâmina de citologia vaginal corada por panótico rápido de uma cadela, identificando células epiteliais que se referem ao período de estro.

2.3.2 Ultrassonografias

A ultrassonografia comum possibilita a visualização das estruturas ovarianas, como os folículos, e o monitoramento longitudinal do desenvolvimento dessas estruturas garante a previsão aproximada do momento da ovulação (KUSTRITZ, 2012).

Na Medicina Veterinária, a ultrassonografia Doppler tem sido utilizada para monitoramento da gestação, e também para caracterizar a circulação nas artérias uterinas e ovarianas em distintas fases do ciclo estral sem gestação. A ultrassonografia bidimensional associada ao Doppler colorido e pulsado proporciona informações em tempo real sobre os aspectos hemodinâmicos dos vasos sanguíneos e da arquitetura vascular (SILVA, L et al, 2011). A principal limitação desses métodos é o custo do equipamento ultrassonográfico (CONFORTI et al, 2014).

2.3.2.1 Emprego da ultrassonografia Doppler para avaliação das artérias uterinas e ovariana

Sabe-se que a atividade cíclica das cadelas é normalmente avaliada por meio da observação de mudanças na característica da mucosa vaginal, e do epitélio vaginal, e da análise de parâmetros hormonais. A ultrassonografia Doppler vem sendo usada para avaliar as alterações estruturais cíclicas do ovário (KOSTER et al., 2001).

Segundo o estudo feito por Koster et al. (2001), foram notadas mudanças no padrão vascular ovariano ao longo das fases do ciclo estral das cadelas, com aumento gradual da perfusão ovariana durante o proestro. No período pré ovulatório, há um aumento marcante intraovariano na intensidade da cor e na velocidade de fluxo sanguíneo, enquanto que, na ovulação e no começo da fase luteal ocorre perfusão máxima durante o exame.

2.3.2.2 Ultrassonografia convencional

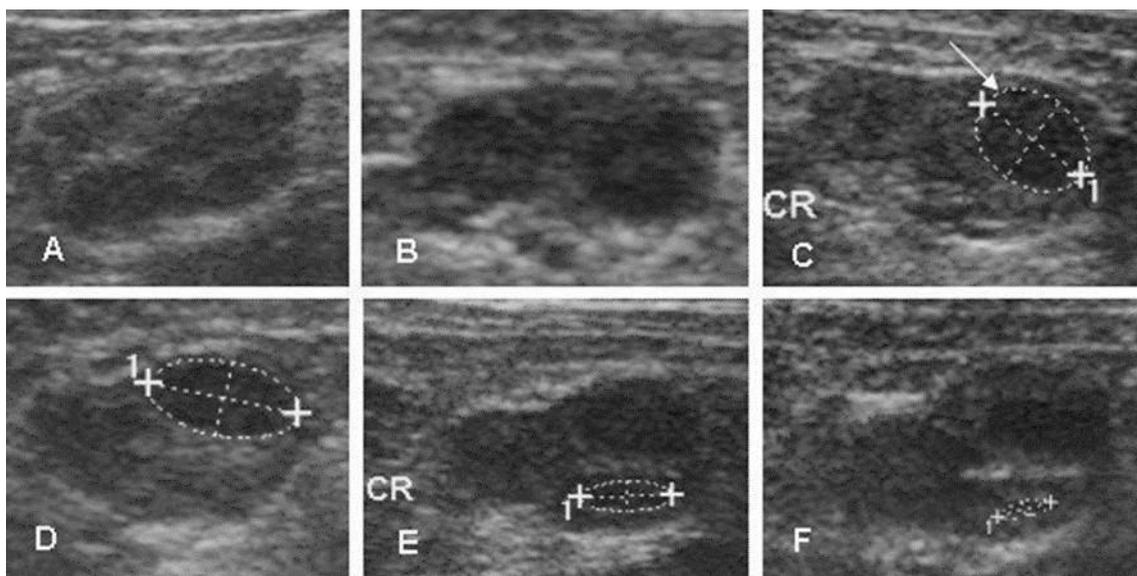
Para avaliar os achados concomitantes de citologia vaginal e ultrassonografia ovariana, Conforti e colaboradores (2014) fizeram um estudo. Em que observaram não só as dimensões dos ovários, mas também a quantidade e a dimensão de estruturas ovarianas, como folículos e corpo lúteo.

Com base nos achados de Concannon e Yeager (1995), as fases do ciclo estral foram determinadas por meio das avaliações ultrassonográficas, que descreveram que, em proestro os folículos ovarianos tornam-se mensuráveis ao

ultrassom. O comprimento máximo do ovário das cadelas é atingido no estro e, após cinco ou seis dias desse momento, ocorre o período de ovulação. De um a cinco dias antes da ovulação ocorre o pico de LH, entretanto, no referido estudo, tanto o período de ovulação quanto o pico de LH foram estimados retroativamente, a partir do dia em que o comprimento ovariano atingiu seu valor máximo.

Já no estudo feito por Bicudo et. al (2010), foram avaliadas cinco fêmeas em fase de proestro, a cada 48 horas, pelo ultrassom convencional e pelo Doppler. No ultrassom convencional, foram realizados planos e cortes sagitais e transversais, para detectar os folículos (Imagem 5) e obter sua mensuração. Concluiu-se que o exame ultrassonográfico convencional, possibilitou a detecção de 100% dos ovários de cadelas durante todo o período de proestro e estro.

Imagem 5- Ultrassonografia do ovário da fêmea



Fonte: BICUDO, et al (2010). Legenda: Imagem ultrassonográfica da dinâmica do crescimento folicular e desenvolvimento luteal do ovário direito do animal.

2.3.3 Dosagens plasmática de progesterona

Um método muito eficaz para a determinação da ovulação é a dosagem de progesterona plasmática, que é bastante utilizada para o acompanhamento do ciclo estral de cadelas (CONCANNON, BATISTA, 1989).

Para determinação de níveis séricos de LH confiáveis seriam necessárias coletas de sangue e avaliações frequentes, pois, apesar de o LH ser um

hormônio diretamente relacionado á ovulação, ele é um hormônio glicoproteico, tornando esse método caro e pouco prático (visto que teria que ser dosado duas vezes ao dia, por vários dias). Já a progesterona é um hormônio esteroide, por isso é mais fácil de ser medida pelo plasma, e seus níveis têm boa correlação com o pico de LH e com a ovulação (LEVY; FONTBONNE, 2007).

A elevação relevante das concentrações séricas de progesterona (>2 ng/ml) indica o pico pré-ovulatório de LH e por consequência, a ovulação ocorrerá 48 horas após o pico (SILVA, A. et al., 2003).

2.3.4 Mensurações da progesterona salivar

Um indicador útil e preciso, que está sendo usado para controlar a atividade ovariana em diversas espécies animais, é a dosagem de progesterona em fluidos biológicos (CARREIRA et al, 2003).

Para a realização do exame, é necessária a obtenção das amostras salivares, que são coletadas através de um swab de poliéster específico. Esse é inserido na boca do animal por cerca de dois minutos e depois introduzido no tubo plástico do dispositivo, que será encaminhado para a centrifuga (por 15 minutos), conforme explicam Lopes et al (2012)

O estudo feito por Lopes (2012) tem como objetivo verificar a eficiência da mensuração das concentrações de progesterona na saliva, sendo uma matriz alternativa ao soro, como um método para apontar a ovulação em cadelas. Amostras de sangue e saliva foram paralelamente colhidas dos animais, a partir dos primeiros sinais de proestro. Concluiu-se que é possível identificar a ovulação em cadelas, pela mensuração de progesterona salivar, visto que há correlação de progesterona na matriz sérica e salivar.

2.4 Inseminação artificial em cadelas

Os animais domésticos tornaram-se cada vez mais importantes com o passar dos anos, principalmente os cães. Em decorrência disso, surge a necessidade de aperfeiçoar e preservar o material genético de reprodutores de alto valor. Com esse objetivo, o homem vem desenvolvendo biotecnologias de reprodução, como a tecnologia de sêmen e inseminação artificial (GONÇALVES et al, 2002).

A primeira inseminação artificial (IA) em cães relatada cientificamente foi feita em 1780 pelo monge italiano Lazzaro Spallanzani. O resultado foi o nascimento de três filhotes saudáveis com características da respectiva raça (JOHNSTON et al, 2001).

Utiliza-se a IA na espécie canina, em animais que são impossibilitados de realizar a monta natural por problemas comportamentais, anatômicos ou que estejam em localidades diferentes (SANTANA, 2012).

Utiliza-se também para proteger animais valiosos de doenças sexualmente transmissíveis, além dos casos de a fêmea não ter o reconhecimento pelo macho, ou vice-versa, casos de agressividade inerente à raça e desproporção sexual (UCHOA et al., 2012).

2.5 Vias de inseminação

2.5.1 Inseminação artificial intravaginal (IAIV)

A inseminação artificial intravaginal (IAIV) é o método mais utilizado para inseminação com sêmen fresco. Nesse procedimento é utilizado um cateter de plástico simples de comprimento adequado, ao qual está ligada uma seringa descartável de plástico contendo o sêmen (JAIN, 2015).

Antes de prosseguir com os procedimentos da IA, deve ser feita a limpeza da área perineal, em particular a área perivulvar, e a palpação transabdominal que geralmente é usada para guiar ou verificar a posição do cateter vaginal. Após a IA, a cadela é mantida com os membros posteriores para cima e a cabeça para baixo, em um ângulo de 45-60° graus. Essa posição garante que não haja refluxo do sêmen, portanto é recomendado que a cadela permaneça assim de 5 a 20 minutos após a realização da IA (JAIN, 2015).

Segundo Fontbonne e Badinand (1993), a IAIV, é de fácil execução (Imagem 6), porém não demonstra bons resultados com sêmen congelado, sendo indicada apenas para sêmen fresco e de boa qualidade (SEAGER, 1977). Já Uchoa (2011) diz que, por ser de fácil execução e oferecer bons resultados com sêmen fresco e refrigerado, a IAIV é a via de escolha na maioria dos casos.

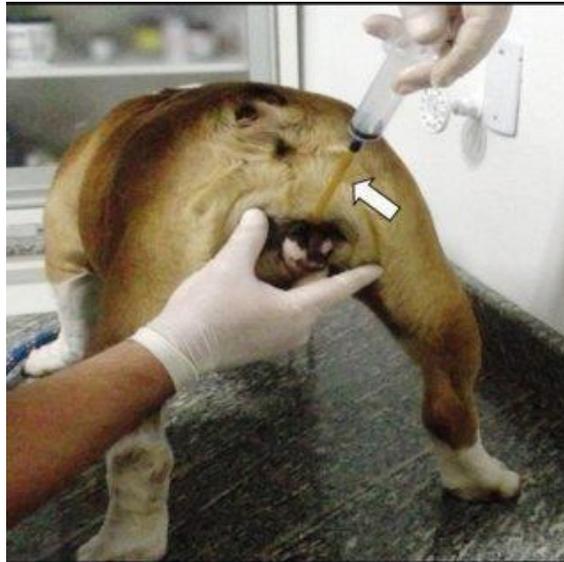
A vagina, em comparação com o útero, é um ambiente mais desfavorável para os espermatozoides, dado que a maioria deles perde a cauda minutos após a deposição do sêmen na vagina cranial. Por conta disso, é fundamental a colocação de um número dez vezes maior de espermatozoides na inseminação intravaginal, para que os resultados sejam similares aos da inseminação intrauterina com sêmen fresco ou congelado (LINDE- FORSBERG, 2001).

Existem vários dispositivos para realizar a IAIV nas cadelas, são elas: Cateter de Osiris, de Foley e Mavic. O Cateter de Osiris (Imagem 7), é rígido com manguito inflável próximo à abertura distal. O manguito é inflado através da válvula externa, resultando em distensão vaginal e ajudando a impedir o refluxo do sêmen ao redor do cateter. Esse procedimento é indicado para cadelas de pequeno e médio porte (MASON, 2018)

Por outro lado, o Cateter de Foley é flexível, e apresenta um manguito inflável próximo à abertura distal. O tamanho é adaptável para todos os portes, e a seringa deve ser deixada em anexo para evitar o refluxo de sêmen. Já o

Cateter Mavic (Imagem 8) é de plástico, possui um manguito inflável na extremidade distal que permite a vedação da vagina para impedir o refluxo e pode ser encontrado em três tamanhos. (MASON, 2018).

Imagem 6- Técnica de IAIV



Fonte: KARLING, ROQUE e OLSSON (2017). Legenda: Introdução da pipeta de inseminação na região do vestíbulo vaginal.

Imagem 7 - Cateter de Osiris



Fonte: MASON (2018). Legenda: Demonstração de um Cateter de Osiris usado para IAIV nas cadelas

Imagem 8 - Cateter Mavic



Fonte: MASON (2018) Legenda: Demonstração de um Cateter de Mavic usado para IAIV nas cadelas

2.5.2 Inseminação artificial intrauterina (IAIU)

A inseminação artificial intrauterina (IAIU) é utilizada quando a via vaginal pode comprometer os resultados da IA (SILVA, L. et al, 1995). A IAIU também é indicada quando o sêmen é congelado ou de baixa qualidade (CORRÊA, 2009).

Podemos realizar a IAIU pela via transcervical ou por meio de procedimentos cirúrgicos transabdominais como a laparoscopia ou laparotomia. A IAIU feita por laparoscopia, apesar de ser uma técnica cirúrgica, é pouco invasiva, de rápida execução e precisa de um menor tempo de anestesia, pois, a longo prazo, ela interfere na motilidade uterina e na migração oócitaria (TSUTSUI et al, 1989).

Já a cateterização transervical via endoscopia vem trazendo resultados satisfatórios na IAIU, porém requer prática, devido à maior dificuldade de execução dependendo da largura e do comprimento da vagina. Ela pode então ser menos utilizada, por necessitar de equipamentos adequados para cada cadela (PRETZER et al., 2006).

O estudo feito por Chirinéa (2008) teve como objetivo comparar, através das taxas de concepção, as técnicas de IA intrauterina por laparotomia e intravaginal utilizando sêmen congelado. Concluiu-se que a taxa de gestação de fêmeas submetidas à técnica de IA intrauterina por laparotomia foi superior à taxa de concepção de fêmeas submetidas à IA de via intravaginal.

2.6 Técnicas de inseminação artificial

2.6.1 Inseminação artificial com sêmen fresco

A técnica de IA mais utilizada para substituir a monta natural dos canídeos é com o sêmen fresco (NEULS, 2007). Essa técnica permite: (i) a prevenção de inúmeras doenças infecciosas, causadoras de aborto e esterilidade; (ii) a escolha de reprodutores com características mais desejáveis; e (iii) a utilização do sêmen de uma única colheita para inseminar diversas fêmeas (KARLING; ROQUE; OLSSON 2017)

O sêmen fresco pode ser depositado imediatamente após a coleta, ou armazenado de três a quatro horas em temperatura ambiente (JAIN, 2015).

Altas taxas de concepção têm sido relatadas na IA com sêmen fresco e refrigerado (CORRÊA, 2009). Um estudo feito por Macedo (2009) obteve taxa de prenhez de 90% utilizando sêmen canídeo fresco e a técnica de inseminação intrauterina transcervical.

A IA feita com sêmen fresco deve ser realizada no início da fase ovulatória, visto que os espermatozoides recém-ejaculados podem sobreviver pelo menos de quatro a seis dias nos reservatórios espermáticos (junção útero- tubárica e glândulas uterinas) (RIJSSELAERE et al., 2004; LUZ et al., 2005). Além disso, o evento da ovulação influencia o transporte e a distribuição dos espermatozoides no trato genital da cadela, devido à atividade quimioterápica e quimiocinética do fluido folicular, que é liberado após a ovulação sobre os espermatozoides (RIJSSELAERE et al., 2004).

Um estudo feito por Silva e colaboradores (1995) avaliou dois grupos de cadelas: um foi submetido à monta natural e outro à inseminação intrauterina por laparoscopia em cadelas em cio natural, utilizando o sêmen fresco. Ambas as inseminações resultaram em gestação e o tamanho da ninhada foi similar. A única diferença foi em relação ao tempo de gestação, que durou em média 65,2 dias nos animais inseminados e 65,4 dias nos que passaram pela monta natural,

Indo ao encontro desses resultados, o estudo feito por Karling; Roque; Olsson (2017) teve como objetivo demonstrar, em animais de companhia, a prática de uma técnica de IA não invasiva, de fácil aplicação e capaz de propiciar maiores taxas de fertilidade, através da deposição do sêmen fresco no interior do útero. Concluiu-se que a utilização do sêmen a fresco é de fácil aplicação e de alta viabilidade, gerando indivíduos saudáveis.

2.6.2 Inseminação artificial com sêmen congelado

Em 1969, Seager obteve a primeira gestação utilizando sêmen canino congelado, tendo como resultado o nascimento de dois filhotes. Com essa nova possibilidade de utilização do sêmen criopreservado, novos caminhos foram abertos para a criação de cães, permitindo que esse material genético de alto valor zootécnico chegue a locais distantes, além de possibilitar que esse material seja armazenado por períodos indefinidos (SILVA, A et al., 2003).

Os espermatozoides dos cães têm uma resposta diferente à criopreservação comparada com outras espécies, normalmente, com alta variabilidade individual e baixas taxas de concepção (YU et al., 2002).

O processo de congelamento e descongelamento causa uma considerável alteração de morfologia, motilidade e longevidade, por isso as taxas de fertilidade são maiores quando é realizada a inseminação intrauterina (JAIN, 2015).

Para obter bons resultados com o sêmen descongelado, o momento da IA é de maior importância (THOMASSEN et al., 2006).

2.6.3 Inseminação artificial com sêmen refrigerado

As amostras que passam por resfriamento e reaquecimento possuem qualidade superior às do sêmen após o descongelamento. Isso só é válido se a amostra for utilizada dentro do período de quatro a cinco dias. Caso seja necessário armazenar por mais do que cinco dias, o congelamento é mais apropriado (ENGLAND, et al., 2014).

O sêmen refrigerado mostra maior flexibilidade do que o sêmen fresco, facilitando o transporte em garrafas térmicas que permanecem viáveis por um intervalo de um a cinco dias, desde que a temperatura seja mantida em torno de 4 e 5°C (ENGLAND; PONZIO, 1996).

Para determinarmos a utilização da técnica de inseminação intrauterina ou cervical, devemos avaliar o período de tempo que o sêmen foi armazenado e a qualidade original da amostra (JAIN, 2015).

No estudo feito por Evangelista et al. (2016), uma cadela foi inseminada utilizando-se sêmen congelado por via intravaginal, por meio do uso de uma pipeta (imagem 9) para a espécie canina, além da manutenção dos membros

posteriores elevados, impedindo o refluxo vaginal. Após 40 dias da IA, foi feita uma ultrassonografia abdominal, confirmando a presença de fetos viáveis. Logo, concluiu-se que o uso de sêmen refrigerado para IA é uma alternativa viável, visando o potencial reprodutivo de cães com características desejáveis.

Imagem 9 -Palheta convencional de 0,5 ml



Fonte: ENGLAND et al. (2014) Legenda: Pipeta convencional de 0,5ml usada para congelar o sêmen de cães, onde uma extremidade é aberta para a aspiração do sêmen.

2.7 Desvantagens da IA

Segundo Tilley e Smith (2014), as desvantagens de uma IA dizem respeito à extensão e à distribuição anatômica de um processo inflamatório, que podem ser resultadas de uma infecção ascendente por microrganismos que habitam normalmente o trato genital inferior e/ou podem ser provocadas durante uma IA, por instrumentos não estéreis e manobras utilizadas durante a técnica.

2.8 Resultados da IA

O sucesso da IA nas cadelas depende de fatores como boa qualidade do sêmen, momento certo para a inseminação, local anatômico apropriado para a deposição do sêmen e do tipo de sêmen (fresco, resfriado ou congelado, conforme afirmam Johnston et al. (2001).

As taxas de concepção analisadas após IA com sêmen fresco são sensivelmente superiores às obtidas com sêmen congelado. Isso pode acontecer devido à viabilidade e fecundidade reduzida dos espermatozoides congelados. Essa redução pode ocorrer devido ao processo de congelação e descongelação,

afetando a qualidade do sêmen após a congelação (LINDE- FORSBERG; FORSBERG, 1989).

De fato, segundo Concannon e Batista (1989), o espermatozoide mantém sua viabilidade após descongelamento por um período de 12 a 24 horas. Além disso, as taxas de concepção são geralmente mais elevadas quando o sêmen congelado é colocado diretamente no útero, em comparação com a técnica de deposição vaginal. Já Silva, L et al. (1995) relatam 100% de gestação quando a IAIU é feita por laparotomia, e também quando a IAIV é realizada utilizando-se a sonda de Osíris, com o sêmen congelado. A IAIU exige menor concentração de espermatozoides por IA do que a técnica de IAIV (SILVA, A et al., 2003)

As taxas de prenhez e o tamanho da ninhada aumentam com o número de inseminações por estro, segundo estudos (LINDE-FORSBERG; FORSBERG, 1989; LINDE –FORSBERG, 2001; THOMASSEN et al., 2006). Por essa razão autores como Silva, L. et al. (1995) recomendam que, quando usado sêmen fresco ou congelado, deve-se realizar duas IA com intervalo de 48 horas. Já outros autores, como Thomassen e colaboradores (2006) indicam a IA a cada 24 horas quando o sêmen for congelado, em técnicas de abordagem não cirúrgica.

3 Conclusão

Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que:

- A fisiologia reprodutiva da cadela é diferente quando comparada com das fêmeas de outras espécies, sendo que as principais diferenças são: Serem monoéstricas; terem longa duração de estro e proestro; apresentarem período longo de pré-implantação; ovularem com oócitos imaturos; e demorarem mais do que o normal no transporte para a tuba uterino.

- Para resultados mais precisos na IA, podemos fazer o controle do ciclo estral com fármacos para inibir ou induzir o estro.
- A citologia vaginal e a dosagem sérica de progesterona são os métodos mais eficazes e confiáveis para a detecção do ciclo estral.
- Na citologia vaginal, o método mais utilizado para a coloração da amostra é o panotico rápido, pela sua velocidade.
- A utilização da ultrassonografia Doppler para identificação de ciclo estral é mais precisa do que a utilização de ultrassonografia convencional, por ela possibilitar a visualização da perfusão ovariana.
- A IA com sêmen fresco apresenta melhores resultados, em comparação com o sêmen congelado, pois, como este passa por um descongelamento, acaba sofrendo alterações em sua morfologia, motilidade e longevidade.
- O sêmen refrigerado mostra resultados superiores aos de sêmen congelado.
- A IA via intravaginal é mais utilizada do que a via intrauterina, devido às dificuldades de manuseio desta.
- A principal desvantagem da IA é a possibilidade do animal apresentar um processo inflamatório.
- Com os exames de identificação e técnicas corretas os resultados de IA em cadelas são satisfatórios.

4 Referências

ALVES, I; MATEUS, M; LOPES, C.S.L. Monitorização do ciclo éstrico da cadela para inseminação artificial ou cruzamento. *In*: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS [PROCEEDINGS OF THE VETERINARY SCIENCES CONGRESS], 2002, Lisboa- Portugal. **SPCV**. Oeiras:out. 2002, p. 177-182.

AYDIN, I et al. Determination of the stages of the sexual cycle of the bitch by direct examination. **Journal of animal and veterinary advances**, p. 1962-1967, 2011.

BICUDO, A.L.C et al. Avaliação ultra-sonográfica convencional e dopplerfluxométrico durante a fase folicular do ciclo estral das cadelas. **Veterinária e zootecnia**, v 17 (4), p. 507-518, dez 2010.

CARDOSO, C.F.R. **Desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na cadela e gata**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2017.

CARDOSO, R.C.S. Terapêutica hormonal aplicada à reprodução na cadela. **Acta Veterinária Brasília**, v. 8, supl. 2, p. 396-401, 2014.

CARREIRA, R.P; COLAÇO, A.A; SILVA, J.R. Avaliação da estabilidade da progesterona em diferentes tipos de amostras: soro e leite desnatado. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Portugal, v. 98, n. 548, p. 207-209, 2003.

CHIRINÉA, V.H. **Inseminação artificial com sêmen congelado em cães**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu , 2008.

CONCANNON, P.W. **Contraception in the dog**. **Vet Annu**. 1995. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9605492>. Acesso em: 25 Mar. 2020.

CONCANNON, P.W; BATISTA, M. **Canine semen freezing and artificial insemination**. **Current Veterinary Therapy**. 1989. Disponível em: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10027321288/>. Acesso em: 7 Jun. 2020.

CONCANNON, P.W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science**, p. 200-210. 2011. Disponível em: <https://www.journals.elsevier.com/animal-reproduction-science>. Acesso em: 18 Mai. 2020.

CONFORTI, V.A. et al. Detecção de estro em cadelas monitoradas por ultrassonografia- ovariana e citologia vaginal utilizando as colorações de

Papanicolau e panótico rápido. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, p. 759-766, ano 2014, 1 Dez. 2014.

DERUSSI, A.A.P; LOPES, M.D. Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo horizonte, v. 33, n. 4, p. 231-237, OUT/dez. 2009.

DYCE, K.M; SACK, W.O; WENSING, C.J.G. O aparelho urogenital, *in*: **Tratado de Anatomia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p. 197-202.

ENGLAND, G.C.W; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled rewarmed dog semen. **Theriogenology**. Fortaleza- CE, v. 46, p. 165-171, Jul. 1996.

ENGLAND, G.C.W; RUSSO, M; FREEMAN, S.L. Artificial insemination in dogs and cats 1: Collection and preservation of canine semen. **In Practice**, v. 36, p. 77-84, fev. 2014. Disponível em: <<https://inpractice.bmj.com/>>. Acesso em: 18/06/2020.

EVANGELISTA, L.S.M; FILHO, M.A.C.S; SOUZA, J.A.T. Inseminação Artificial Intravaginal em cadela da raça Dogo Argentino utilizando sêmen refrigerado: Relato de caso. **PUBVET**. Teresina- PI, v. 10, n. 3, p. 244-247, mar. 2016.

FONTBONNE, A. Infertility in bitches and queens: recent advances. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 202-209, abr./jun. 2011.

Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/>>. Acesso em: 15/06/2020.

FONTBONNE, A; BADINAND, F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. **J. Reprod. Fert**, p. 325-327, 31 Dez. 1993.

FRANDSON, R.D; WILKE, W.L; FAILS, A.D. **Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, p. 337-341.

GRANDI, F.; VANNUCCHI, C. I. Aplicações da citologia vaginal na clínica médica de pequenos animais. In: **BESERRA, H. E. O.; COSTA, L. D. (Org.)**.

Citopatologia veterinária diagnóstica. São Paulo: MedVet, 2014. p. 99-119.

GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002.

JAIN, P et al. Artificial insemination in Dogs: A promising tool for dog breeders and owners. **Indo-Am. J. Agric. & Vet. Sci**, p. 11-17, jun. 2015.

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. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 277–287, dez. 1988.

JURCZAK, A et al. Equine chorionic gonadotropin and human chorionic gonadotropin stimulation increase the number of luteinized follicles and the progesterone level compared with cabergoline stimulation in anoestrus bitches. **Reprod Dom Anim**. Polonia, v. 51, p. 562-568, 2016.

KARLING, P.C; ROQUE, W.C; OLSSON, D.C. Inseminação artificial a fresco em uma fêmea bulldog inglês: relato de caso. **Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ**, Santa Catarina, v. 5, n. 2, p. 194-210, 2017.

KONIG, H.E; LIEBICH, H.G. **Anatomia dos Animais Domésticos**: Texto e atlas colorido. 6. ed. Porto alegre: Artmed, 2014.

KOSTER, K; NAUTRUP, C.P; APEL, A.R.G. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. **Journals of Reproduction and Fertility**. Alemanha, p. 453–461. 2001.

KUSTRITZ, M. V. R. Managing the reproductive cycle in the bitch. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. EUA, v. 42, p. 423-437, maio 2012.

LEVY, X; FONTBONNE, A. Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. **Rev Bras Reprod Anim**. Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p. 128-134, jan./mar 2007. Disponível em: <www.cbra.org.br> Acesso em: 7/06/2020.

LINDE-FORSBEG, C. **Intra-Uterine Insemination in the Dog Using the Scandinavian Trans-Cervical Catheter and a Comparison with other Methods.** *Ivis*. 2001. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Concannon/linde/chapter_frm.asp?LA=1 (1 of 7) [8/15/02 4:28:15 PM]>. Acesso em: 26/05/2020.

LINDE-FORSBERG, C.L; FORSBERG, M. 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**, p. 299-310. 1989.

LOPES, P.R; FURTADO, P.V; OLIVEIRA, C.A. Eficiência da mensuração de progesterona salivar para identificar a ovulação em cadelas. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, p. 269-276, 22 ago. 2012. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/51707/55768>. Acesso em: 14/05/2020.

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**, Belo Horizonte, v. 29, n. 3/4, p. 142-150, jul./dez 2005.

MACEDO. S. P. **Inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em cadelas da raça Retriever do Labrador.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 2009

MASON, S.J. Current Review of Artificial Insemination in Dogs. **Article in press, Vet Clin Small Anim.** Austrália, v. 48(4), p. 567-580, 2018

NEULS, G. M. **Efeito da curva de refrigeração na qualidade do sêmen canino.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

OLIVEIRA, E.C.S; MARQUES, 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.

POST, K. Canine Vaginal Cytology During the Estrous Cycle. **Can Vet J**, v. 26(3), p. 101-104. 1985. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1679999/pdf/canvetj00603-0013.pdf/?tool=EBI>>. Acesso em: 18/06/2020.

PRETZER, S.D; LILLICH, R.K; ALTHOUSE, G.C. Single, transcervical insemination using frozen–thawed semen in the Greyhound: A case series study. **Theriogenology**. EUA, v. 65, p. 1029-1036, 1 abr. 2006.

REYNAUD, K et al. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction research**, p. 193-201, 2005. Disponível em:<<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/130/2/1300193.xml>>. Acesso em: 07/09/2020.

RIBEIRO, A.P.C et al. Maturação in vitro de oócitos caninos: aspectos fisiológicos e sua relação com a evolução da técnica. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p. 50-57, jan./mar 2010. Disponível em:
<<http://cbra.org.br/br/>> Acesso em: 15/06/2020.

RIJSSELAERE, T et al. **Sperm distribution in the genital tract of the bitch following artificial insemination in relation to the time of ovulation.**

Reproduction. Bélgica, v. 128 (6), p. 801-11, 2004. Disponível em:

<<https://rep.bioscientifica.com/>> Acesso em: 26/05/2020

SANTANA, J.P.S. **Inseminação artificial canina utilizando sêmen fresco**. Trabalho de Disciplina (Pós-graduação de Medicina Veterinária) - Centro Universitário da Grande Dourados, Dourados, 2012.

SCHUTTE, A.P. Canine Vaginal Cytology-III Compilation and Evaluation of Cellular Indices. **J. Small Anim. Prac**, V. 8(6), p. 313 - 317, jun. 1967.

SEAGER, S. W. J; PLATZ, C. C. Artificial insemination and frozen semen in the dog. **Veterinary Clinics of North America**, v. 7, p. 757-764, Novembro 1977.

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**. Fortaleza- CE, v. 98, p. 53-60, 2003.

SILVA, L.D.M. Controle do ciclo estral em cadelas. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 40, n. 4, p. 180-187, out./dez 2016.

SILVA, L.D.M; BARBOSA, C.C; PEREIRA, B.S. O uso da ultrassonografia Doppler na reprodução de cadelas e gatas. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 198-201, abr./jun 2011.

SILVA, L.D.M; LIMA, D.B.C. Aspectos da fisiologia reprodutiva da cadela. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 42, n. 3/4, p. 135-140, jul./dez 2018.
Disponível em: www.cbra.org.br. Acesso em: 1 jun. 2020.

STORNELLI M.C et al. Pharmacokinetics of eCG and induction of fertile estrus in bitches using eCG followed by hCG. **Theriogenology**. Argentina, v. 78, p. 1056-1064, 15 set. 2012.

THOMASSEN, R et al. Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using anon-surgical approach. **Theriogenology**. Noruega, v. 66, p. 1645-1650, out. 2006.

TILLEY, L.P; SMITH, F.W.K. **Consulta Veterinária em 5 Minutos**: Espécie canina e felina. 5. ed. Manoela, 2014.

TSUTSUI, T et al. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: Observations through uterine fistula. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 51(3), p. 560-565, maio. 1989.

UCHOA, D. C. **Água de coco em pó (ACP-106c) como diluente para conservação de sêmen e inseminação artificial na espécie canina**. Tese (Doutorado em Medicina veterinária) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

UCHOA D.C, et al. Criopreservação de sêmen e inseminação artificial em cães. **Ciência Animal**, Fortaleza- CE, v. 22(1), p. 132-142, 2012

VIEIRA, M.M.F et al. Detecção do ciclo estral por meio de citologia vaginal de cadelas atendidas no hospital veterinário da Univiçosa/ FASICA. **Anais IV SIMPAC**, Viçosa-MG, v. 4, n. 1, p. 143-148, jan - dez 2012.

YU. I, et al. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. **Cryobiology**. EUA, v.44, p. 62-78, 2002.

