

RELAÇÃO ENTRE CITOLOGIA VAGINAL E DOSAGEM DE PROGESTERONA SÉRICA NO CICLO ESTRAL DE CADELAS

BARON, Stefanie Fatima Bearzi¹
VIEIRA, Bruna Todeschini²

RESUMO

A fêmea canina apresenta características únicas, como a prolongada duração do proestro e estro, ovulação de oócitos imaturos e um ciclo estral monoéstrico não-estacional, sem ligação a estações do ano. Essas particularidades desafiam a padronização reprodutiva e o desenvolvimento de biotecnologias assistidas. Em síntese, este estudo busca aprimorar a precisão do diagnóstico da ovulação em cadelas, oferecendo informações relevantes para criadores e profissionais da reprodução canina. O estudo envolveu 10 cadelas da raça American Bully, com idades de seis meses a dois anos, recrutadas de uma clínica veterinária. Esses cães, reproduzidos exclusivamente por inseminação artificial, foram acompanhados observando-se os comportamentos de cio. Quando identificados sinais de monta e o encerramento da secreção vulvar, as fêmeas foram submetidas à dosagem de progesterona. A ampla variação nos eventos específicos dificulta a determinação precisa do momento próximo à ovulação ao se basear apenas na citologia vaginal. Assim, a dosagem de progesterona mostrou-se mais confiável para identificar as alterações ovarianas no ciclo estral da cadela.

PALAVRAS-CHAVE: reprodução. biotecnologias. ovulação. diagnóstico.

1. INTRODUÇÃO

O interesse pela reprodução em cães vem aumentando, e com a demanda de novos criadores, o entendimento sobre o assunto é de suma importância.

Quando comparada a outras espécies, a fêmea canina apresenta características distintas e notáveis. Alguns dos atributos notáveis incluem uma maior duração do proestro e estro, ovulação de oócitos (células reprodutivas) em estágio imaturo, um prolongado período pré-implante e um período de transporte na tuba uterina que pode durar cerca de 9 a 12 dias (REYNAUD *et al.*, 2006).

O ciclo estral na fêmea canina é classificado como monoéstrico não-estacional, o que significa que as mudanças hormonais ocorrem ao longo do ano e não estão vinculadas a estações específicas. Isso resulta em uma variabilidade na expansão e sincronização dessas mudanças hormonais (JOHNSTON *et al.*, 2001).

A puberdade na fêmea canina marca a transição para a fase reprodutiva e é indicada pelo início do primeiro cio. A idade em que isso ocorre pode variar consideravelmente e está diretamente relacionada ao tamanho e raça da cadela. Esse processo é caracterizado pela adaptação gradual entre a crescente atividade gonadotrófica e o sistema reprodutivo, permitindo a interação adequada entre a

¹ Acadêmica do curso de Medicina Veterinária da Fundação Assis Gurgacz (FAG). E-mail: stefaniebearzi@gmail.com

² Docente do curso de Medicina Veterinária da Fundação Assis Gurgacz (FAG). E-mail: brunavieira@fag.edu.br

esteroidogênese (produção de hormônios esteroides) e a gametogênese (produção de células reprodutivas) (THADEI, 2008).

Segundo Concannon e Verstegen (2005), ao se aprofundar sobre as características reprodutivas das cadelas, se entende que a duração de cada fase do ciclo estral pode variar para cada indivíduo, o que dificulta o momento ideal para estabelecer as técnicas de reprodução assistida.

A técnica de Inseminação Artificial em cadelas tem se mostrado eficaz, especialmente quando a cópula natural entre os progenitores não é possível. O êxito desse procedimento está diretamente ligado ao entendimento anatômico e fisiológico do sistema reprodutivo da fêmea, com especial atenção ao seu ciclo estral (KARLING *et al.*, 2017). Apesar das perspectivas positivas, as pesquisas em biotecnologias reprodutivas em cães enfrentam limitações, principalmente devido à falta de conhecimento sobre as características específicas do ciclo estral das cadelas (BRUM *et al.*, 2018).

A citologia vaginal auxilia na determinação do tipo de célula presente em cada fase do ciclo reprodutivo de cadelas, oferecendo benefícios significativos no que diz respeito à programação de coberturas, previsão do parto e diagnóstico de patologias reprodutivas. Além disso, é um exame de natureza simples, pouco invasivo e com baixo custo (COSTA *et al.*, 2009; BAPTAGLIN *et al.*, 2014). Para médicos veterinários e tutores responsáveis, a citologia vaginal representa uma ferramenta de grande relevância, uma vez que complementa eficazmente o manejo reprodutivo de cadelas (HENSON, 2003).

Um dos erros mais comuns encontrados na prática clínica é a cobertura da fêmea em um momento inadequado para a fecundação. Um dos erros vistos seria o uso de sêmen de baixa qualidade ou a restrição na quantidade de coberturas, o que pode resultar em insucesso na fecundação (GOODMAN, 2001). Desse modo, determinar o momento exato da ovulação se faz necessário para obter resultados satisfatórios nas técnicas de reprodução (REYNAUD *et al.*, 2006).

A citologia vaginal é uma ferramenta amplamente utilizada para monitorar o ciclo estral da cadela, e desempenha um papel satisfatório e de grande relevância nesse processo. No entanto, é crucial observar que essa técnica não oferece a precisão necessária para confirmar o dia exato da ovulação. Nesse contexto, a dosagem sérica de progesterona (P4) desempenha um papel essencial ao confirmar e complementar as informações obtidas por meio do exame citológico (ALVES *et al.*, 2002).

Em síntese, o presente estudo tem como objetivo aprimorar a precisão no diagnóstico da ovulação em cadelas, com o propósito de fornecer informações de relevância substancial tanto para criadores quanto para profissionais envolvidos na área de reprodução canina.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

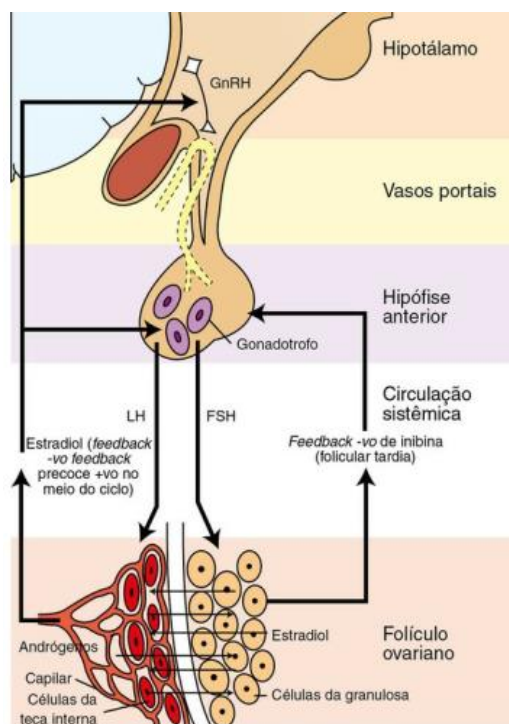
2.1 FISIOLOGIA REPRODUTIVA

O ciclo estral das cadelas é um processo complexo que pode ser dividido em diferentes fases, incluindo proestro, estro, diestro e anestro. Durante esse ciclo, ocorrem alterações hormonais que desencadeiam mudanças clínicas e citológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

As cadelas são classificadas como monoéstricas não estacionais, o que significa que podem reproduzir uma ou duas vezes por ano. O período entre um proestro e outro é conhecido como intervalo interestro (IE), e sua duração pode variar de aproximadamente 16 a 56 semanas (CONCANNON *et al.*, 2005).

A regulação hormonal das gônadas é governada pelo complexo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (figura 1). O primeiro hormônio desempenhando um papel fundamental nesse processo é o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), o qual é produzido e secretado pelo hipotálamo. O GnRH tem a função de estimular as células gonadotrofas, localizadas na glândula hipófise anterior (CUNNINGHAM e KLEIN, 2014).

Figura 1: Resumo das interações hipotalâmico hipofisário-ovarianas durante a fase folicular do ciclo. FSH: Hormônio folículo estimulante. GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas; LH: Hormônio luteinizante. -vo: negativo; +vo: positivo.



Fonte: Adaptado de CUNNINGHAM e KLEIN, 2014.

Essas células gonadotrofas, em resposta à ação do GnRH, secretam dois hormônios-chave: o Hormônio Luteinizante (LH) e o Hormônio Folículo Estimulante (FSH), ambos desempenham funções significativas nos ovários. O LH está envolvido na indução da ovulação e na subsequente formação do corpo lúteo, enquanto o FSH regula o desenvolvimento e a maturação dos folículos ovarianos. Esse sistema hormonal complexo é essencial para a regulação do ciclo estral e a manutenção da função reprodutiva das cadelas, assegurando que os eventos reprodutivos ocorram no momento adequado (CUNNINGHAM e KLEIN, 2014).

O FSH desempenha um papel crucial no início da fase folicular, estimulando a diferenciação do oócito primordial até que ele alcance o estágio de folículo terciário ou antral. Nesse estágio, ocorre a formação de lacunas no interior do folículo, que são preenchidas com líquido folicular rico em estrógeno (KUTZLER, 2018).

O estrógeno desempenha um papel importante no desenvolvimento dos folículos e na preparação do sistema reprodutivo para a ovulação. Por outro lado, o Hormônio Luteinizante desempenha um papel decisivo na regulação do ciclo estral. Ele estimula a diferenciação das camadas do folículo e a síntese de enzimas hidrolíticas, as quais promovem a desintegração do tecido conjuntivo que reveste o folículo. Isso torna o revestimento do folículo mais frágil, permitindo sua ruptura, o que é necessário para desencadear a ovulação (CUNNINGHAM e KLEIN, 2014).

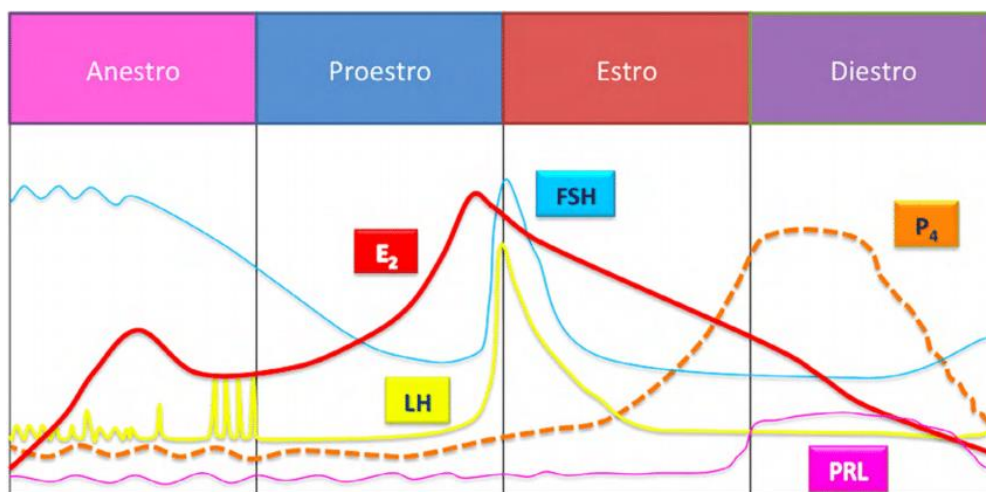
Além disso, o LH inicia o processo de luteinização, que é a transformação das células do folículo de secretoras de estrógeno em secretoras de progesterona. Esse processo já está em andamento antes da ovulação. Com o aumento do LH, ocorre uma diminuição na secreção de estrógeno, ao mesmo tempo em que se inicia a produção de progesterona (CUNNINGHAM e KLEIN, 2014).

Durante o anestro, as concentrações de Hormônio Folículo Estimulante aumentam, enquanto as de Hormônio Luteinizante diminuem. No anestro tardio, ocorre um aumento mais significativo nos níveis de FSH, o que desempenha um papel determinante na foliculogênese e no início do proestro em cães. Além disso, o FSH induz a expressão de receptores de LH nas células da granulosa ovariana (KUTZLER, 2018).

De acordo com Rangel (2018), durante o proestro, observam-se elevadas concentrações de estrógeno (figura 2), atingindo seu pico entre 24 e 48 horas antes de sua conclusão. Ao mesmo tempo, os folículos ovarianos começam a sofrer o processo de luteinização, que precede a ovulação. Esse processo desencadeia a liberação de progesterona, cujos níveis começam a aumentar progressivamente. À medida que a progesterona se eleva, as concentrações de estradiol começam a diminuir. Dessa maneira, o início do estro ocorre quando os níveis de progesterona atingem uma concentração de aproximadamente 1 ng/ml.

O pico de LH ocorre durante a transição do proestro para o estro, e a ovulação ocorre 48 a 60 horas depois, processo que pode durar de 24 a 96 horas. Os níveis de progesterona aumentam quando o estro começa, portanto antes da ovulação eles estão entre 2 e 4 ng/ml, enquanto concentrações entre 5 e 10 ng/ml estão relacionadas ao momento da ovulação. Quando as concentrações de estradiol diminuem para menos de 15 ng/ml, o estro termina (RANGEL, 2018).

Figura 2: Endocrinologia do ciclo estral da cadela. Durante a fase de anestro, temos a concentração do hormônio folículo estimulante (FSH) alta, quando ocorre o desenvolvimento dos oócitos que serão ovulados. Na fase de proestro podemos observar que há um aumento progressivo das concentrações de estradiol (E₂), quando a cadela demonstra os sinais de cio. Logo quando as concentrações dos hormônios folículo estimulante e luteinizante (LH) atingem o pico de concentração, ocorre a ovulação dos oócitos, ainda imaturos, e a luteinização do folículo ovulatório, formando o corpo lúteo. A fase que se inicia nesse momento é o estro - o estrogênio tem sua concentração diminuída, e o corpo lúteo inicia a produção de progesterona, e a concentração aumenta progressivamente. Na fase de diestro, caso a cadela não esteja gestante, o corpo lúteo sofre involução, diminuindo a concentração de progesterona, iniciando o ciclo novamente. Nessa mesma fase podemos observar um aumento na prolactina (PRL), preparando as glândulas mamárias para uma possível gestação.



Fonte: Adaptado de RANGEL, 2018.

A idade em que as cadelas entram na puberdade pode variar, mas, em geral, isso ocorre por volta dos sete meses de idade. No entanto, essa faixa etária pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a raça e o porte do animal. Normalmente, cães de pequeno porte tendem a entrar na puberdade mais cedo em comparação com cães de grande porte, que podem iniciar seu ciclo reprodutivo por volta dos nove a doze meses de idade. É importante observar que essas variações são resultado da interação entre fatores genéticos e ambientais (CONCANNON, 2011).

2.2 FASES DO CICLO ESTRAL

2.2.1 PROESTRO

O proestro é a fase inicial do ciclo estral da cadela, que normalmente dura de sete a nove dias (SILVA, 2016). Durante esta fase, o crescimento dos folículos ovarianos e o aumento nas concentrações de estrógeno são responsáveis pelos sinais clínicos característicos, que incluem inchaço da vulva e a presença de uma secreção sanguinolenta nos lábios vulvares. A cadela nesta fase exibe sinais de provocar a atenção dos machos, embora ainda não esteja pronta para a monta (VICENTE e APPARICIO, 2015).

A influência do estrógeno realiza modificações no epitélio vaginal, e ao realizar o exame citológico, é possível notar o predomínio de células superficiais, além de hemácias provenientes da secreção sanguinolenta, e a ausência de leucócitos no início do proestro. A secreção sanguinolenta da vulva ocorre devido à diapedese eritrocitária, que é o extravasamento de glóbulos vermelhos do sangue, originados da ruptura dos vasos sanguíneos subepiteliais no endométrio (VICENTE e APPARICIO, 2015).

Durante o proestro, as concentrações séricas de progesterona aumentam de aproximadamente 0,5 ng/mL (valor típico no anestro) para cerca de 1 ng/mL, ocorrendo 24 a 48 horas antes da onda pré-ovulatória de LH. Posteriormente, as concentrações de progesterona atingem de 2 a 4 ng/mL por ocasião da onda de LH, que é seguida, após dois dias, pelo início da ovulação, quando a concentração de progesterona varia de 4 a 10 ng/mL. A particularidade na espécie canina é que o aumento na concentração de progesterona ocorre mesmo antes da ovulação e da formação do corpo lúteo (VICENTE e APPARICIO, 2015).

2.2.2 ESTRO

A fase do estro é caracterizada pelo comportamento receptivo da cadela, que permite o coito ao firmar seus membros no chão e levantar a cauda, assumindo a posição conhecida como "bandeira". Essa fase tem uma duração média de aproximadamente 9 dias, embora possa variar consideravelmente, abrangendo um intervalo de 3 a 21 dias (SILVA, 2016).

Nelson e Couto (2015), destacam que, em contraste com o proestro, a vulva da cadela torna-se menos túrgida, e ocorre uma diminuição até a ausência de corrimento sanguinolento. Esse declínio na concentração de estradiol, que ocorre nos dias que antecedem a ovulação, coincide com um

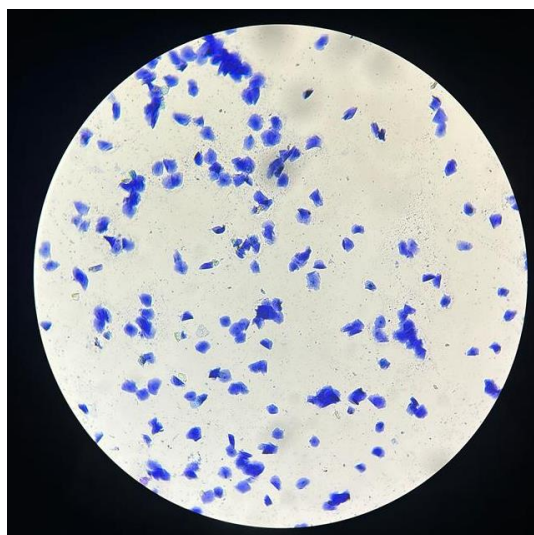
aumento concomitante de progesterona e o início do aumento nos níveis séricos de LH. A ovulação, por sua vez, ocorre tipicamente de 24 a 48 horas após o pico de LH (BENETTI *et al.*, 2004).

Essas alterações hormonais induzem mudanças comportamentais nas fêmeas, que estão associadas ao estro e à onda pré-ovulatória de LH, que desencadeiam a ovulação e a formação do corpo lúteo (NELSON e COUTO, 2015). É importante notar que, de acordo com Okens (2004), as células luteinizadas, responsáveis pela produção de progesterona, já são funcionais antes mesmo do desenvolvimento completo do corpo lúteo.

Após a ovulação, os oócitos primários liberados permanecem nas tubas uterinas por um período de 2 a 3 dias, onde amadurecem antes de se tornarem aptos para a fertilização. Esse intervalo é conhecido como o período fértil, e o sêmen do macho é capaz de fertilizar os oócitos por um período que varia de 3 a 4 dias, podendo se estender até 6 dias (NELSON e COUTO, 2015).

No estro, os tipos de células predominantes na citologia vaginal são, superficiais nucleadas ou anucleadas (figura 3), com ausência de neutrófilos e presença de bactérias (CONCANNON, 2011).

Figura 3: Microscopia óptica de citologia vaginal com predominância de células superficiais anucleadas, coradas com panótico rápido, em um aumento de 10X.



Fonte: Carlos Eduardo Tomaz, 2023.

2.2.3 DIESTRO

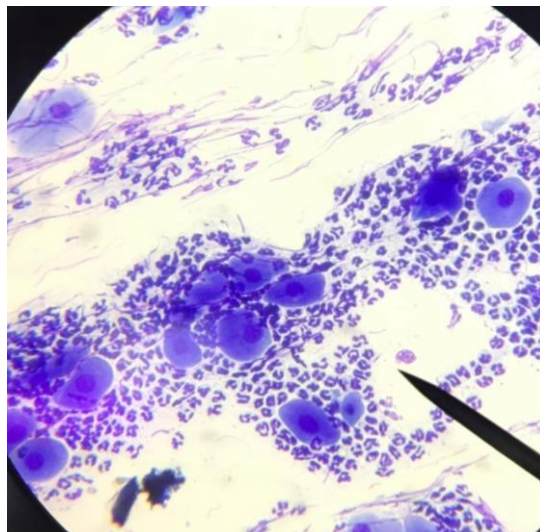
O diestro representa a fase lútea do ciclo estral. A concentração sérica de progesterona se eleva acima da concentração basal após as duas primeiras semanas da ovulação e da onda de LH, tornando-se dependente da quantidade de LH e prolactina. Essa concentração de progesterona entra

em declínio ao longo dos dois meses subsequentes. Nas cadelas gestantes, observa-se uma queda drástica no pré-parto (NELSON e COUTO, 2015).

Esta fase se estende por cerca de 60 dias no ciclo estral. Durante esse período, as cadelas mostram refratariedade a atividades reprodutivas. Essa fase é caracterizada pela atividade luteínica, na qual a progesterona desempenha um papel central ao longo de todo o diestro. As alterações fisiológicas observadas durante essa fase estão diretamente relacionadas à presença da progesterona (VICENTE e APPARICIO, 2015).

Durante o diestro, a progesterona atinge concentrações de 15 a 80 ng/mL até aproximadamente o dia 30 do ciclo. Posteriormente, ocorre um declínio gradual dessas concentrações, atingindo valores abaixo de 1 ng/ml. Na citologia vaginal são encontrados neutrófilos e há uma predominância de células parabasais e intermediárias (figura 4) em relação às superficiais queratinizadas (CONCANNON, 2011).

Figura 4: Microscopia óptica de citologia vaginal com predominância de células intermediárias e grande quantidade de leucócitos, coradas com panótico rápido, em um aumento de 40x.



Fonte: Carlos Eduardo Tomaz, 2023.

2.2.4 ANESTRO

O anestro é uma fase do ciclo reprodutivo da cadela que se caracteriza pela involução do útero, e é considerada uma etapa de quiescência do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. A duração do anestro pode variar consideravelmente, dependendo de fatores como raça, estado de saúde, idade, ambiente, época do ano e outros fatores correlacionados (JOHNSTON *et al.*, 2001).

Durante o anestro, ocorrem ondas curtas e esparsas de LH (hormônio luteinizante). Esse aumento abrupto do LH plasmático induz dois eventos secretórios significativos, embora de curta duração: um pico de LH imediatamente antes do início do proestro e outro pico que precede o início do estro, seguido da ovulação. Esses aumentos intermitentes de LH durante o anestro desempenham um papel importante no recrutamento de folículos necessários para o próximo ciclo reprodutivo subsequente (VICENTE e APPARICIO, 2015).

Uma vez recrutados para o grupo pré-ovulatório, esses folículos regulam seletivamente a secreção de gonadotrofinas pela hipófise por meio de feedback negativo. Durante essa fase, os folículos não amadurecem completamente, regredindo após um breve período de atividade, sem chegar a se transformar em células luteinizadas produtoras de progesterona (FELDMAN e NELSON, 2004).

No anestro, a citologia vaginal geralmente revela uma predominância de células parabasais e intermediárias, podendo ou não incluir a presença de bactérias e neutrófilos (LEÃO, 2003).

2.3 CITOLOGIA VAGINAL

O epitélio vaginal é altamente estimulado pelas mudanças hormonais, de tal maneira que, sob a ação do estrógeno e posteriormente pela progesterona, as células se afastam progressivamente em direção ao lúmen vaginal e se degeneram na medida em que ocorre o distanciamento do suprimento nutritivo, apresentando, em sua maioria, diferentes aspectos morfológicos em cada fase do ciclo estral (VICENTE e APPARICIO, 2015).

Ao se realizar esta técnica é possível avaliar a morfologia e a proporção dos tipos de células epiteliais ali presentes, como a presença de eritrócitos, leucócitos e secreções, indicando assim, o nível de dominância hormonal, podendo então ser possível a estimativa do período fértil (CHAVES *et al.*, 2004).

São quatro tipos de células identificadas pela citologia vaginal. Em ordem, das células mais imaturas para as mais maduras, são as basais, parabasais, intermediárias e superficiais (CONCANNON, 2011).

Segundo Alisson e colaboradores (2008), as células basais estão localizadas ao longo da membrana basal e dão origem a outros tipos de células epiteliais observados no esfregaço vaginal.

As células parabasais são as menores células observadas. Possuem núcleos redondos com tamanho e forma uniformes com citoplasma basofílico. Muitas células parabasais podem ser

observadas nos esfregaços vaginais de animais que ainda não atingiram a puberdade, não devendo ser confundida com células neoplásicas (FELDMAN e NELSON, 2004).

As células intermediárias possuem bordas citoplasmáticas redondas a irregulares e pregueadas (BAKER e LUMSDEN, 1999). Também podem ser denominadas células intermediárias superficiais ou células intermediárias transicionais (ALLISON *et al.*, 2008).

As células superficiais são caracterizadas por pequenos núcleos redondos a picnóticos, com bordas celulares anguladas a pregueadas. Com o envelhecimento das células superficiais, acabam se tornando degeneradas e seu núcleo é perdido, se tornando anucleadas (FELDMAN e NELSON, 2004).

Antes do início da colheita para citologia vaginal é realizado primordialmente uma limpeza da região vaginal, utilizando-se solução fisiológica, seguida da realização da técnica (BAPTAGLIN *et al.*, 2014).

A técnica consiste em colher o material com auxílio de um swab, introduzindo na vulva do animal em ângulos, primeiramente de 45° e em seguida 180°, para que se obtenha material de toda região desde a área cranial da vagina, até a caudal. Logo após, este material é fixado em lâminas com identificação, enumeradas e coradas com corante rápido Romanowsky tipo Panótico Rápido® (DA COSTA *et al.*, 2009).

2.4 DOSAGEM HORMONAL

A dosagem hormonal se baseia na quantidade de progesterona encontrada no sangue, sendo um método bastante utilizado no acompanhamento do ciclo estral por conta de sua eficácia em relação aos resultados (CONCANNON 2011). A progesterona é um hormônio esteroide de fácil determinação, podendo ser medida através do soro sanguíneo, e de acordo com os níveis encontrados há o indício de uma boa correlação tanto com o pico de LH quanto a ovulação (LÉVY e FONTBONNE, 2007).

A progesterona é produzida pelo corpo lúteo, glândulas adrenais e, durante a gestação, pela placenta. Sua secreção é estimulada pelos efeitos do hormônio luteinizante (LH). A progesterona é responsável pelo preparo do endométrio para a inserção e manutenção da gestação, fazendo com que a atividade secretora de glândulas do endométrio aumente, diminuindo a motilidade do miométrio (SILVA, 2016). Atua também cooperando com os estrógenos no comportamento de cio e auxilia o desenvolvimento do tecido secretor da glândula mamária, desempenhando um papel fundamental na regulação hormonal do ciclo estral (HAFEZ, 2004).

Segundo Vicente e Apparicio (2015), o método mais eficiente para o acompanhamento do ciclo estral e estimativa do momento da ovulação é a dosagem da concentração sérica de progesterona, uma vez que a cadela é a única dentre as fêmeas domésticas que apresenta aumento de progesterona 2 a 3 dias antes da ovulação. Os valores de progesterona sérica são inferiores a 1,0 ng/mL durante o anestro e na maior parte do proestro, e apresentam aumentos rápidos próximo ao pico de hormônio luteinizante (LH).

Evidenciou-se, nas dosagens paralelas de progesterona e LH, que o início da elevação significativa da progesterona corresponde ao pico do LH, o qual pode ser uma referência importante para a estimativa de ovulação, uma vez que esta ocorre 48 horas após o pico desse hormônio (VICENTE e APPARICIO, 2015).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as etapas do estudo foram conduzidas em conformidade com as diretrizes éticas de pesquisa animal e contaram com a aprovação de um comitê de ética (CEUA/FAG nº 003/2023). O bem-estar das cadelas foi garantido e medidas foram implementadas para garantir que elas não sofressem qualquer desconforto ou dano desnecessário ao longo do estudo.

Para a condução deste estudo, foram selecionadas 10 cadelas da raça *American Bully*, com idades variando de 6 meses a 2 anos. Estas cadelas foram recrutadas a partir de amostras populacionais atendidas em uma clínica veterinária. A seleção dessa raça específica e faixa etária buscou garantir a representatividade de um grupo homogêneo para fins de análise do ciclo estral.

Essa raça de cães é reproduzida exclusivamente por meio de técnicas de inseminação artificial, que podem envolver o depósito do sêmen intravaginal ou intrauterino. O acompanhamento das fêmeas é realizado pelos responsáveis, que observam os comportamentos de cio. Quando são identificados sinais de aceitação de monta e o encerramento da secreção vulvar, os responsáveis encaminham as fêmeas para a dosagem de progesterona. Os responsáveis pelos animais assinaram um termo de autorização, onde estavam cientes que as fêmeas participariam do trabalho.

O monitoramento do ciclo estral das cadelas foi realizado por meio da análise citológica vaginal e dosagem sérica de progesterona. Durante o atendimento clínico, foram coletadas amostras de células da parede vaginal utilizando swabs estéreis. Essas amostras foram preparadas em lâminas de vidro, submetidas a coloração com corante rápido Romanowsky tipo Panótico Rápido® e posteriormente examinadas ao microscópio óptico. Isso permitiu a identificação das diferentes fases do ciclo estral com base nas características celulares observadas.

Para complementar, a dosagem sérica de progesterona foi realizada junto com a análise citológica, coletadas por meio de punção venosa e submetidas a análise laboratorial para determinar as concentrações de progesterona. Utilizou-se o kit de imunoensaio por partículas de Európio e o equipamento VCheck® (ECO-diagnóstica, Minas Gerais, Brasil), o qual possui um kit próprio para dosagem de progesterona em cadelas.

Os dados coletados foram submetidos a análise estatística para avaliar a correlação entre os resultados da citologia vaginal e as concentrações séricas de progesterona em cada fase do ciclo estral. Métodos estatísticos, como análise de variância (ANOVA) e testes de correlação, foram empregados para quantificar essas relações.

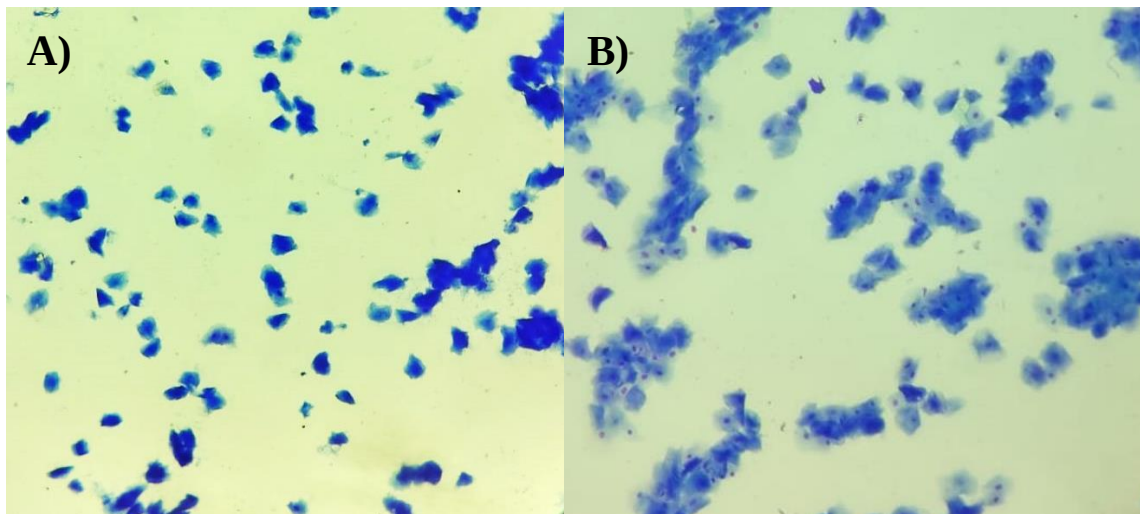
Após a coleta e análise dos dados, os resultados foram interpretados e discutidos em relação aos objetivos da pesquisa, proporcionando insights sobre o ciclo estral em cadelas e sua monitorização.

4. ANÁLISES E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Quanto às concentrações de progesterona observadas durante o proestro (<1,0 ng/ml) e no estro, com variações nos níveis, os valores foram considerados consistentes com os achados descritos na literatura consultada (FELDMAN e NELSON, 2004; JOHNSTON *et al.*, 2001) para os mesmos períodos.

A citologia vaginal esfoliativa, quando avaliada em conjunto com as manifestações clínicas, possibilitou a diferenciação das fases do ciclo estral, especialmente em cadelas cujo histórico dos ciclos estrais anteriores não era conhecido. Durante o estro, observou-se predominantemente a presença de células superficiais queratinizadas nas lâminas analisadas, sendo raramente identificados outros tipos celulares (Figura 5a). Já as fêmeas que se encontravam em proestro, as células eram majoritariamente intermediárias e polimorfonucleares (Figura 5b).

Figura 5: Citologia vaginal das fêmeas avaliadas no estudo. A) citologia vaginal da fêmea F2: células queratinizadas, sem núcleos, caracterizando a fase de estro. B) citologia vaginal da fêmea F10: observam-se células intermediárias, possuindo núcleo pequeno, caracterizando a fase de proestro.



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

O estudo conduzido por Bouchard e colaboradores (1991), revelou uma considerável variação nas características da citologia vaginal em relação à data da ovulação. Os resultados indicaram que as cadelas ovularam entre o 5º e o 9º dia, após a citologia vaginal apresentar 80% das células queratinizadas (indicativo do fim da fase de proestro), bem como entre o 5º e o 8º dia antes da citologia vaginal mostrar o início do diestro (queda de 20% nas células queratinizadas).

O estudo realizado por Wright (1990), destacou a prática comum de acompanhar as fases do ciclo estral em cadelas utilizando apenas a citologia vaginal. Em seu trabalho, Wright realizou inseminação artificial (IA) com base nos resultados da citologia vaginal, seguida por uma contraprova que envolveu a dosagem da progesterona sérica para comparação. A IA foi realizada quando a citologia vaginal indicava estro, sendo repetida a cada 2 a 4 dias até a citologia apontar a fase de diestro. Os resultados revelaram uma correlação entre a data ideal estimada para a IA pela citologia vaginal, e a data indicada pelos níveis séricos de progesterona.

O acompanhamento frequente da citologia desde o início do proestro pode auxiliar na determinação da onda pré-ovulatória de LH, indicada pela presença de 80% de células superficiais no exame citológico, sinalizando uma alta concentração de estrógeno e indicando que o pico de LH ocorrerá aproximadamente em 48 horas (ENGLAND e CONCANNON, 2002).

Na tabela 1, observa-se que a citologia vaginal é um indicativo eficaz para determinar a fase do ciclo estral. Das fêmeas analisadas, 60% (n=6) exibiram mais de 70% de células superficiais

anucleadas, indicando a fase de estro. As restantes (40%, n=4) apresentaram acima de 80% de células intermediárias, caracterizando a fase de proestro. Adicionalmente, os valores de progesterona estão associados a suas respectivas fases.

Tabela 1: Proporção de células nucleadas e anucleadas vistas em exame de citologia vaginal, sua respectiva fase, concentração de progesterona sérica em cadelas reprodutoras e sua respectiva fase do ciclo estral, de acordo com os valores de referência.

Fêmea	Células nucleadas	Células anucleadas	Fase- citologia	Progesterona (ng/ml)	Fase- progesterona
F1	20%	80%	Estro	9,03	Ovulação (5,0 a 12,0ng/ml)
F2	30%	70%	Estro	6,46	Ovulação (5,0 a 12,0ng/ml)
F3	10%	90%	Estro	12,13	Pós ovulação (>12,0ng/ml)
F4	20%	80%	Estro	12,85	Pós ovulação (>12,0ng/ml)
F5	90%	10%	Proestro	<1,0	Anestro/ proestro (<1,0ng/ml)
F6	20%	80%	Estro	4,46	Pós pico de LH (3,0 a 4,9 ng/ml)
F7	10%	90%	Estro	16,57	Pós ovulação (>12,0ng/ml)
F8	90%	10%	Proestro	<1,0	Anestro/ proestro (<1,0ng/ml)
F9	90%	10%	Proestro	<1,0	Anestro/ proestro (<1,0ng/ml)
F10	90%	10%	Proestro	<1,0	Anestro/ proestro (<1,0ng/ml)

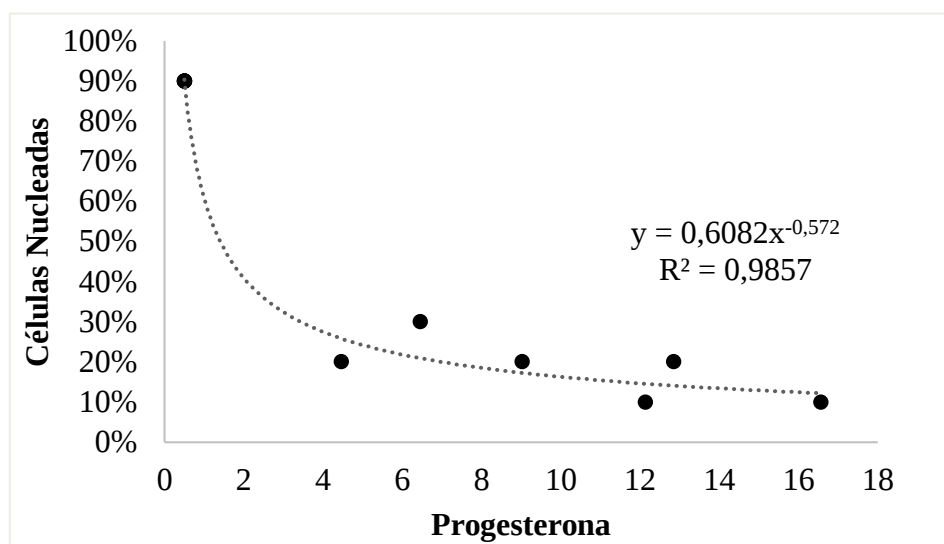
Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Conforme destacado por Henson (2004), os tipos celulares desempenham um papel crucial na determinação das fases do ciclo estral. No entanto, é importante notar que, de acordo com o tipo celular predominante, o animal pode indicar mais de uma fase do ciclo estral. Por exemplo: 1) a predominância de células parabasais pode estar presente nas fases de proestro, diestro ou anestro; 2) a predominância de células intermediárias pode indicar fase de proestro; 3) células superficiais confirmam a fase estral em período próximo à ovulação (estro). Segundo os autores, além da citologia, podem ser associadas dosagens de progesterona, juntamente com o histórico clínico do animal, evitando erros na detecção da fase do ciclo estral.

Os valores de referência da concentração de progesterona e sua relação ao ciclo estral foram obtidos com a própria fabricante do kit (ECO-diagnóstica, Minas Gerais, Brasil). De acordo com a dosagem de progesterona, apenas uma fêmea se encontrava na fase de pós pico de LH (F6=4,46. Valor de referência para a fase: 3,0 a 4,9 ng/mL).

O presente trabalho observou uma correlação ($R=0,9857$) entre os resultados da citologia vaginal e as dosagens de progesterona (Gráfico 1). A tendência apresentada foi o surgimento de células anucleadas, caracterizando a fase de estro, conforme a concentração de progesterona aumenta.

Gráfico 1: Relação entre a concentração de progesterona sérica (eixo X) e presença de células nucleadas (eixo Y) em cadelas reprodutoras.

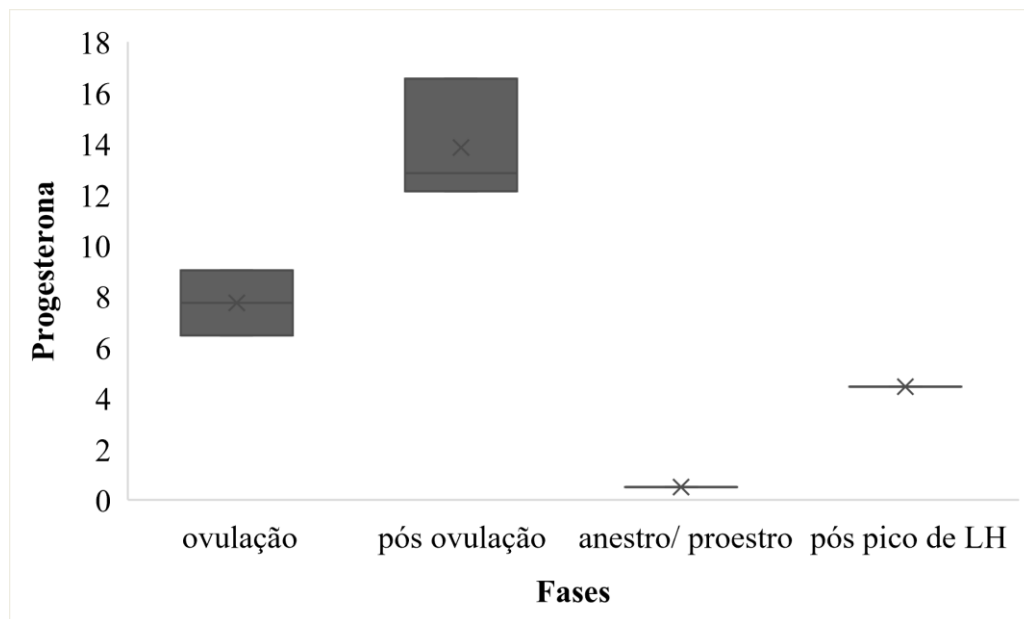


Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

De acordo com Vicente e Aparício (2015), os oócitos que são liberados na ovulação estão na fase de oócito primário, portanto, ainda devem passar por maturação, que pode levar de 2 a 5 dias. Segundo os autores, o momento ideal para a realização da inseminação artificial é próximo desse período de maturação ovocitária. A ovulação ocorre aproximadamente 48 horas após o hormônio luteinizante (LH) atingir o seu pico, o que coincide com o início das elevações significativas de progesterona. Esse aumento pode ser levado em conta para estimar o momento da ovulação, sendo mais provável a realização da inseminação no momento mais propício.

As fêmeas que apresentaram citologia compatível com a fase de estro variaram na dosagem de progesterona de 4,46 ng/mL a 16,57 ng/mL. Considerando a interpretação dessas pacientes, com base na dosagem de progesterona, é possível identificar as fases de pós-pico de LH, ovulação e pós-ovulação, momentos os quais a realização da inseminação artificial seria ideal. Essa larga variação nos eventos específicos dificulta a determinação de um momento próximo à ovulação, quando levado em conta apenas a citologia vaginal. Portanto, a dosagem de progesterona apresentou-se mais fidedigna para identificação das alterações ovarianas que o ciclo estral da cadela apresenta (Gráfico 2).

Gráfico 2: Concentração sérica de progesterona e sua respectiva fase do ciclo estral em fêmeas reprodutoras (n=10).



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Oliveira e colaboradores (2021), realizaram a avaliação do histórico clínico e comportamental da fêmea, a citologia vaginal e a dosagem de progesterona e estrogênio para determinar a fase do ciclo estral. Os pesquisadores encontraram relação da citologia para definir qual a fase do ciclo estral, mas reiteram que a dosagem hormonal deve ser realizada em paralelo para evitar erros na detecção da fase.

Outro grupo, Oliveira e colaboradores (2018), realizou a determinação da fase do ciclo comparando a dosagem de progesterona e a citologia vaginal, e concluíram que a progesterona é o método mais eficiente, pois existe correlação entre as concentrações de progesterona e hormônio luteinizante, permitindo a detecção do momento mais próximo da ovulação.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados analisados revelaram uma relação entre a concentração de progesterona e a citologia vaginal das cadelas. No entanto, a avaliação exclusiva da citologia vaginal apresenta limitações na precisão dos eventos hormonais relacionados ao momento da ovulação, período primordial para o sucesso das tecnologias reprodutivas utilizadas em algumas raças de cães.

Uma abordagem acessível financeiramente pode envolver a avaliação da citologia vaginal durante períodos de alterações comportamentais da cadela. À medida que ocorrem mudanças na celularidade, a dosagem de progesterona pode ser realizada para definir o melhor momento para a inseminação, proporcionando uma estratégia mais eficiente e viável economicamente.

O entendimento das particularidades do ciclo estral da cadela, aliado ao conhecimento dessas particularidades, permite um melhor aproveitamento de cada ciclo estral, evitando esperas desnecessárias pelo próximo ciclo e permitindo uma melhor utilização do estro natural.

REFERÊNCIAS

- ALLISON R.W., MADDUX J.M. **Subcutaneous glandular tissue: mammary, salivary, thyroid, and parathyroid**. In: Cowell R.L., Tyler R.D., Meinkoth J.M., DeNicola D.B., editors. Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat. ed 3. St. Louis: Mosby; 2008:112-117.
- ALVES, I.; MATEUS, M.; LOPES DA COSTA, L. Monitorização do ciclo éstrico da cadela para inseminação artificial ou cruzamento. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS. Lisboa: CIISA/Faculdade de Medicina Veterinária, 2002. p. 177-182
- BAKER R.H., LUMSDEN J.H., editors. **Color atlas of cytology of the dog and cat**. Mosby, St. Louis, 1999;235-251. 253-62.
- BAPTAGLIN M., GOMES P., HERZOG R.O., REGHELIN J.P., ZIMPEL A.V., BORGES KRUEL L.F. **Determinação do ciclo estral por citologia vaginal – relato de caso**, 2014.
- BENETTI, A. H.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A. Concentrações séricas de progesterona, 17 b-estradiol e cortisol durante o final do próestro, estro e diestro gestacional em cadelas. **Ciência Rural**, p. 471-478, 2004.
- BOUCHARD, G. et al. Seasonality and variability of the interestrous interval in the bitch. **Theriogenology**, v. 36, n. 1, p. 41-50, 1991.
- BRUM, D. S.; DELFINO, M.; SOUZA, P.; LEIVAS, F. G. **Biotecnias da reprodução uso de citologia vaginal esfoliativa para determinação de período fértil em cadelas**. Anais de Ensino, Pesquisa e Extensão. Universidade Federal do Pampa, 2018.
- CHAVES, A.R. et al. Exame citológico esfoliativo na prevenção de lesões ginecológicas de cadelas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V. 28, n. 5, p. 282-286. 2004.

CONCANNON PW; VERSTEGEN J. **Some uniques aspects of canine and feline female reproduction important in veterinary pratice.** In: World Small Animal Veterinary Association, 30, 2005, México. Proceedings. México: WSAVA, 2005. p.1-8.

CONCANNON, P.W. **Reproductive cycles of the domestic bitch.** Animal Reproduction Science, v.124, p.200-210, 2011.

COSTA E.C.F., LÉGA E., NEVES L. **Estimativa do Ciclo Estral do por Citologia Vaginal em Cadelas (Canis Familiaris, Linnaeus, 1758)** da Região de Ituverava- SP. NucleusAnimalium.v.1. n.2. Nov de 2009.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária.** 5 ed. Elsevier Brasil, 2014.

DA COSTA, E. C. F.; LÉGA, E.; NEVES, L. Estimativa da fase do ciclo estral por citologia vaginal em cadelas (canis familiaris, linnaeus, 1758) da região de ituverava-SP. **Nucleus Animalium**, v. 1, n. 2, 2009.

ENGLAND, G.; CONCANNON, P. W. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. **Recent advances in small animal reproduction**, n. A1231, p. 0602, 2002.

FELDMAN, E. C; NELSON, R. W. **Canine and Feline. Endocrinology and reproduction.** 3ed. Philadelphia: WB Saunders. Cap. 33. p. 1016-1044, 2004.

GOODMAN, M. **Ovulation timing: Concepts and controversies.** Veterinary Clinics: Small Animal Practice, v. 31, n. 2, p. 219-235, 2001.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Hormônios, fatores de crescimento e Reprodução. **Reprodução Animal.** 7. ed.; São Paulo: Manole, 2004. p. 42.

HENSON K.L. Sistema reprodutor. **Atlas de citologia de cães e gatos.** São Paulo: Roca, 2003, cap. 11, 233-263p

JOHNSTON, Shirley Diane; KUSTRITZ, Margaret V.; OLSON, Patricia Schultz. **Canine and feline theriogenology.** 2001.

KARLING, P. C., ROQUE, W. C.; OLISSON, D. C. Inseminação artificial a fresco em uma fêmea bulldogue inglês: relato de caso. **Journal of Veterinary Science and Public Health**, v. 5, n. 2, p. 194-210, 2017.

KUTZLER, M. A. Estrous Cycle Manipulation in Dogs. condition in the cat and dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.48, p.581-594, 2018.

LEÃO K. M. **Técnicas de inseminação artificial**. 2003. 33 f. Reprodução Animal (Pós-graduação) -Curso de Medicina Veterinária, Unesp, Botucatu, 2003.

LÉVY, X.; FONTBONNE, A. Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 31, n. 1, p. 128-134, 2007.

NELSON, Richard; COUTO, C. Guillermo. **Medicina interna de pequenos animais**. Elsevier Brasil, 2015.

OKENS, A. C. S. **Ciclo estral e manejo reprodutivo da fêmea cadela** In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de medicina interna veterinária. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap. 157, p. 1592-1601.

OLIVEIRA, Ana Flávia Faria. **Determinação do período fértil em cadelas por meio de citologia vaginal e dosagem sérica de progesterona**. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Centro Universitário de Formiga – UNIFOR. Formiga, Minas Gerais, 41f. 2018.

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

OLIVEIRA, G. P., DE SOUZA, H. F. F., BATISTA, D. P., SILVA, A., DA SILVA, W. C., SILVA, L. K. X. (2021). **Emprego da citologia vaginal na detecção da fase do ciclo estral de cadelas e sua relação com a idade e escore de condição corporal**, Belém, Pará. *Research, Society and Development*, 10(9), e25310917921-e25310917921.

RANGEL, L. Ciclo estral. In. PORTA, LR; MEDRANO, JHH *Fisiología reproductiva de los animales domésticos*. **Cidade do México: FMVZ-UNAM**, 2018.

REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; et al. In vivo canine oocyte maturation, fertilization, and early embryogenesis: a review. **Theriogenology**, v. 66, p. 1685- 1693, 2006.

SILVA, L. D. M. Controle do ciclo estral em cadelas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 40, n. 4, p. 180-187, 2016.

THADEI, C.L. **Pseudociese nas cadelas**. 26. maio. 2008. Disponível em: http://www.saudeanimal.com.br/artig161_print.htm. Acesso em: 15 ago. 2023.

VICENTE, WRR; APPARICIO, M. **Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos**. São Paulo: MedVet, cap, v. 2, 2015.

WRIGHT, P. J. Application of vaginal cytology and plasma Progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. **Journal of small animal practice**, v. 31, n. 7, p. 335-340, 1990.