

Gonadotrofinas na indução do estro em cadelas

Gonadotrophin in the induction of estrus in bitches

RIBEIRO, Ana Paula Coelho ¹; VICENTE, Wilter Ricardo Russiano ²; SANTOS, Ivo Walter³; PIRES, Eliandra Antônia ⁴; ALVES, Aracélle Elisane ⁴; APPARÍCIO, Maricy ⁵

¹Doutora em Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Setor de Obstetrícia Veterinária, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

²Professor Titular da disciplina de Obstetrícia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

³Professor Titular da disciplina de Reprodução Animal, Universidade Federal do Paraná, Departamento de Reprodução Animal, Palotina, Paraná, Brasil.

⁴Doutoranda em Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Setor de Obstetrícia Veterinária, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

⁵Doutoranda em Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Setor de Obstetrícia Veterinária, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

*Endereço para correspondência: apcribeiro@hotmail.com

RESUMO

O estudo foi realizado no Setor de Obstetrícia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp (Campus de Jaboticabal) com o objetivo de analisar a eficiência de gonadotrofinas na indução do estro em cadelas, por meio da avaliação da citologia vaginal, dosagem sérica de progesterona e morfologia ovariana. Foram utilizadas nove fêmeas caninas, de diferentes raças (e sem raça definida), com idades entre um e quatro anos. O protocolo de indução compreendeu aplicações diárias de gonadotrofina coriônica equina (eCG) na dosagem de 30 UI/kg, uma vez ao dia, por 9 dias, seguido de aplicação de gonadotrofina coriônica humana (hCG) na dosagem de 500 UI/ por animal, em aplicação única no dia 10 do protocolo. Foi avaliada a citologia vaginal a partir do início do protocolo, a cada 48 horas, até o final do mesmo. No dia 12 do protocolo, foi realizada coleta de sangue para dosagem de progesterona e avaliação das estruturas ovarianas, por meio de laparotomia. Todos os animais apresentaram alterações progressivas de citologia vaginal para a fase de proestro, seguida de estro. Os valores médios das concentrações séricas de progesterona foram de 14 ng/mL, apresentando-se acima dos níveis fisiológicos esperados para a fase avaliada, demonstrando luteinização exacerbada. Os ovários apresentaram altas taxas de folículos crescidos, bem como rompidos, sendo observada a efetividade do protocolo na indução da ovulação. Ainda, como achado do presente estudo,

observou-se presença de fluido folicular muito viscoso e em íntima aderência aos oócitos. Em conclusão, o protocolo utilizado parece ser efetivo na indução de estro em cadelas, sob análise dos parâmetros avaliados.

Palavras-chave: cadela, citologia vaginal, progesterona, ovário

SUMMARY

The present study aimed to investigate the efficiency of gonadotrophins to induce estrus in bitches, which was monitored using vaginal cytology, serum progesterone and ovarium morphology. Nine bitches of different breeds ageing one to four years were used. The protocol of estrus induction consisted of daily administration of eCG (equine chorionic gonadotrophin) at dose of 30 UI/kg, once daily, for nine days, followed by a single administration of hCG (human chorionic gonadotrophin) at dose of 500 UI/animal on the tenth day. Vaginal cytology was done every two days. On the 12nd day after the beginning of this protocol, ovariohysterectomy was performed to collect the ovaries; serum was collected for progesterone concentration. Every animal showed cytological alterations by the progression from proestrus to estrus. Progesterone concentrations revealed values above the expected which may demonstrate exacerbate pre-ovulatory luteinization. Ovaries presented high rates of growing follicles as well as ruptured, demonstrating the effectiveness of

the protocol in promoting the ovulation. The follicular fluid was viscous and adhered to the oocytes. In conclusion, the employed protocol seems to be effective in the induction of the estrus in bitches.

Keywords: bitch, ovary, progesterone, vaginal cytology

INTRODUÇÃO

A indução do estro em cadelas vem sendo realizada com diferentes objetivos, entre eles, a busca de acasalamento em tempo determinado pelo criador, o término de um anestro prolongado por causas não determinadas ou falhas para iniciar o período de puberdade (ZÖLDAG et al., 2001). Mais recentemente, pesquisadores têm usado a indução de estro na tentativa de obtenção de oócitos supostamente mais competentes destinados à maturação *in vitro*.

Diversos protocolos de indução são usuais. Atualmente, a prolactina é conhecida como principal luteotrofina em caninos (VERSTEGEN, 1997). Assim, tem sido verificado que o uso de agonistas da dopamina ocasiona supressão na secreção de prolactina, diminuindo o intervalo interestro. Dentre os agonistas mais utilizados, estão: a bromocriptina (ZÖLDAG et al., 2001; KOOISTRA et al., 1999); a cabergolina (ONCLIN et al., 1993), e a metergolina (HANDAJA-KUSUMA et al., 1993).

SHILLE et al. (1989) citam que o uso das gonadotrofinas visa mimetizar a interação hipófise-ovário para o desenvolvimento folicular, maturação oocitária e ovulação, mas concluíram em seu estudo que esses compostos não corresponderam na indução de estro fértil. Os principais protocolos de indução usando gonadotrofinas e compostos estrogênicos incluem eCG : 20 UI/kg por 5 a 10 dias consecutivos, seguido de aplicação única de hCG (500-1000 UI por animal) (ENGLAND & ALLEN, 1991); DES (diethiletilbestrol): 5 mg/kg até início do proestro, seguido de 5mg/kg no quinto dia do proestro; FSH: 5mg/IM nos dias 9 e 11 do proestro

(MOSES et al., 1988); e, ainda, o uso de GnRH em administração pulsátil (CONCANNON et al., 1997).

Segundo Concannon (1989), os resultados insatisfatórios dos protocolos de indução de estro, utilizando gonadotrofinas com ou sem estimulação prévia com estrógeno, são conseqüências da falta de conhecimento dos eventos hormonais e foliculares responsáveis pelo término do anestro nas cadelas. Além disso, o mesmo autor afirma que a eficiência diminuída desses protocolos pode ser devido a uma hiperestimulação ovariana, falhas nos processos de ovulação, luteólise prematura ou formação de anticorpos.

A despeito desses dados, protocolos de indução de estro utilizando gonadotrofinas têm sido empregados para provocar o crescimento folicular e proporcionar, assim, a coleta e oócitos pré-ovulatórios para a maturação *in vitro* (YAMADA et al., 1992; YAMADA et al., 1993). Tem sido defendido que a competência meiótica de oócitos de outras espécies é influenciada pelo tamanho de ambos, foliculo (MOTLIK e FULKA, 1986; LONERGAN et al., 1994; MARTINO et al., 1994;) e oócito (FAIR et al., 1997; OTOI et al., 1997).

Fisiologicamente, o ciclo reprodutivo da cadela apresenta quatro fases bem distintas, estabelecidas por alterações hormonais que induzem transformações de ordem morfológicas, clínicas e citológicas no trato genital. Essas fases são conhecidas como proestro, estro, metaestro/diestro e anestro, sendo que o período de receptividade sexual é denominado estro (JÖCHLE & ANDERSEN, 1977).

O proestro nessa espécie é caracterizado por duração média de 7-10 dias (CONCANNON et al., 1989), edema de lábios vulvares e secreção sanguinolenta

que pode ser observada na rima vulvar (JÖCHLE & ANDERSEN, 1977). O caráter sanguinolento dessa secreção é resultado da diapedese de hemácias proveniente da ruptura de vasos subepiteliais endometriais (FELDMAN & NELSON, 1997) em conjunto com a secreção das glândulas endometriais (HOFFMANN, 1996). Ao proestro, segue-se o estro, com duração média de 5-9 dias. A turgidez vulvar observada no proestro dá lugar à maciez e flacidez, que se fazem acompanhar de supressão e modificação da secreção vaginal de sanguinolenta para serosanguinolenta e permissão à cópula (FELDMAN & NELSON, 1997). As alterações endócrinas relacionadas ao mecanismo de interrupção do anestro na cadela não se encontram totalmente esclarecidas (KOOISTRA et al., 1999).

Nos esfregaços vaginais, a proporção relativa de diferentes tipos de células pode ser usada como identificadora do ambiente endócrino e, portanto, da fase do ciclo estral (ARTHUR et al., 1996). O número de células basais e parabasais, sediadas nas camadas mais profundas do epitélio, reduz-se à medida que o ciclo avança para o estro e dá lugar ao aparecimento de células intermediárias superficiais e células superficiais, que compõem o estrato espinhoso e superficial, de modo que, nos quatro ou cinco dias precedentes ao pico de LH, o índice de células parabasais torna-se inferior a 5% (CONCANNON & DIGREGORIO, 1986). Isso ocorre porque, sob a influência da elevação progressiva de estrógeno, acontece a estratificação epitelial e proliferação celular. As células mais distantes do estrato basal, sofrendo com a redução de aporte nutricional e de oxigênio, perdem a capacidade de exocitose e acabam se degenerando (FELDMAN & NELSON, 1997; VERSTEGEN, 1999). Por isso, o predomínio de células superficiais no esfregaço é indicativo de progressão do ciclo e está associado ao efeito estrogênico máximo alcançado, assinalando a

expressão hormonal desse momento (FELDMAN & NELSON, 1997).

Segundo Mialot (1988), o esfregaço vaginal do anestro é caracterizado quase que exclusivamente por células parabasais e também por algumas células intermediárias; o diestro por células intermediárias e parabasais isoladas; o proestro tem predominância de células intermediárias e superficiais nucleadas, além de numerosos glóbulos vermelhos e o estro caracteriza-se por células superficiais anucleadas ou com núcleo picnótico e poucos glóbulos vermelhos.

Quanto aos padrões hormonais, tem-se que, contrariamente à liberação de FSH, a de LH é determinante, pois, sua elevação pré-ovulatória determina, na cadela, o fim da fase folicular e o ingresso na fase luteal (SHILLE & STABENFELDT, 1980). O pico de LH é o momento marcante do ciclo estral dessa espécie, uma vez que todos os eventos da ovulação à parição lhe são retroativos (RODRIGUES & RODRIGUES, 2002).

A concentração de progesterona eleva-se acima do nível basal antes do estabelecimento do pico de LH, devido à capacidade de síntese e à secreção mediada pelas células foliculares ovarianas, que se tornam funcionais mesmo antes do desenvolvimento do corpo lúteo (FELDMAN & NELSON, 1997; LEAVIT et al., 1971). Os níveis de progesterona que, no início do proestro, se encontravam abaixo de 1 ng/mL, aumentam de forma que valores de 2 a 3 ng/mL, registrados no momento do pico de LH, sobem para $4,9 \pm 1,0$ ng/mL no instante da ovulação (BOUCHARD et al., 1991), embora estudos recentes tenham revelado índices médios de 2,3 ng/mL no dia da ovulação (HASE et al., 2000).

Segundo Jhonston, Kustritz & Olson (2001), uma concentração plasmática de progesterona entre 1,0-1,9 ng/mL indica ovulação em até 48 horas, entre 2,0-3,9, indica ovulação em até 24 horas e, 4,0-10,0, indica que o animal já ovulou ou está ovulando.

Foi demonstrado que o processo ovulatório mantém relação estreita com o aumento de progesterona. A falha na sua elevação faz com que a proporção na concentração sérica progesterona/estradiol não se modifique, o que impede o desencadeamento do pico de LH e a ovulação (VERSTEGEN, 1999).

Quanto às características morfológicas ovarianas, essas também se modificam na dependência da fase do ciclo estral. Quando a hipófise inicia a liberação de FSH e LH em grandes quantidades no início do período de maturidade sexual, os folículos iniciam seu crescimento e, cerca de 48 horas após a onda pré-ovulatória de LH, eles se rompem liberando o oócito, no processo denominado ovulação. Após a ruptura dos folículos, essas estruturas se luteinizam rapidamente, tornando-se sítios organizados capazes de sustentar a produção de progesterona por longos períodos. Essas estruturas, não mais císticas, são denominadas corpos lúteos e são reconhecidas facilmente na superfície ovariana por sua coloração salmão. Durante esse período, ainda, o útero pode se tornar espesso em preparação para a implantação, o sangramento microvascular pode parar ou diminuir e pode haver desenvolvimento glandular visível (WALLACE et al., 1992).

Hewitt & England (1998), analisando macroscopicamente o ovário de cadelas, descreveram que, durante o anestro, ocorre predominância de folículos primários, no proestro, predominam os antrais, no estro, os chamados pré ovulatórios e, no diestro, não há folículos aparentes. Encontraram ainda tecido luteal pronunciado no diestro e remanescente no anestro. Hewitt, Watson & England (1998) e Otoi et al. (2000) relataram que os folículos ovarianos da cadela apresentam localização cortical nos ovários, permanecendo abaixo da superfície ovariana e somente se tornando aparentes pouco antes da ovulação.

Assim, com base nas características fisiológicas do ciclo reprodutivo da fêmea canina, já determinadas e citadas

anteriormente, o estudo foi realizado com o objetivo de descrever as alterações da citologia vaginal e da morfologia ovariana, bem como a determinação da dosagem sérica de progesterona em animais submetidos à indução de estro com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG).

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido nas dependências do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, Setor de Reprodução e Obstetrícia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Campus de Jaboticabal. Foram utilizadas nove fêmeas caninas, com idade entre 1 e 4 anos, de diferentes raças ou sem raça definida. As fêmeas pertenciam a proprietários que manifestavam interesse em requisitar a cirurgia de ovariosalpingo-histerectomia (OSH) para seus animais. Os procedimentos estiveram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal.

Todos os animais passaram por exame clínico prévio, antes de serem incluídos no experimento. O exame clínico, assim como o de rotina, englobou anamnese, exame físico e exames complementares, sendo que a anamnese foi realizada com ênfase para o sistema reprodutivo. Por fim, todos os animais foram submetidos a uma triagem, buscando-se selecionar animais em anestro comprovado por citologia vaginal de baixa celularidade, com predomínio de células basais e parabasais, associada à dosagem sérica de progesterona inferior a 1ng/mL.

Os animais selecionados para o experimento foram submetidos a aplicações diárias de gonadotrofina coriônica equina (eCG) na dosagem de 30 UI/kg, uma vez ao dia, via por 9 dias, seguida da aplicação de gonadotrofina coriônica humana (hCG), na dosagem de 500 UI/ por animal, em aplicação única no

dia 10 (adaptado de ENGLAND & ALLEN, 1991).

O exame citológico vaginal foi realizado a cada 48 horas após início do protocolo de indução, objetivando analisar a progressão da fase folicular.

O início do proestro foi detectado pelos sinais clínicos característicos dessa fase, que são: edema de vulva, atração de machos e secreção vaginal sanguinolenta. A coleta de material para a citologia vaginal foi realizada com o uso de *swab*. Após introdução do mesmo até a porção cranial da vagina, foram efetuados movimentos de rotação em toda a circunferência vaginal, sendo sempre mantido em contato com a mucosa. O *swab* foi então rotacionado sobre lâminas de vidro devidamente identificadas, as quais, depois de secas, foram coradas pelo método de Romanowsky (soluções de Triarilmetano, Xantenos e Tiazinas). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico de luz, em aumento de 400x, verificando-se a porcentagem das diferentes classes celulares encontradas no epitélio vaginal: basais, parabasais, intermediárias, superficiais nucleadas e superficiais anucleadas.

O início do estro foi determinado quando a citologia vaginal evidenciava presença de mais de 80% de células superficiais com ausência de núcleo ou núcleo picnótico em associação ao comportamento de estro.

No dia da realização da OSH, ou seja, 12 dias após início do protocolo de indução, os animais foram submetidos à punção da veia jugular para coleta de amostras de sangue destinadas à dosagem sérica de progesterona.

A dosagem foi realizada através do método de quimioluminescência, no Laboratório

Endomed, na cidade de Jaboticabal, São Paulo, e objetivou evidenciar o grau de luteinização dos folículos pré-ovulatórios.

No dia 12, após início do protocolo, realizou-se a OSH para coleta dos ovários e útero. Os mesmos foram submetidos à avaliação macroscópica que compreendeu o registro dos seguintes dados:

1. Nos ovários: coloração, textura de superfície, presença de folículos túrgidos, folículos com ponto de ruptura, corpo hemorrágico, corpo lúteo e cistos foliculares.

2. No útero: presença de hiperplasia cística do endométrio, presença de secreção intraluminal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, pode-se verificar como ocorreu a evolução do proestro e início de estro sob o aspecto da citologia vaginal. Com referência a esse parâmetro, verificou-se que, de maneira geral, os animais apresentaram características semelhantes, com uma progressão de proestro a estro marcada pelo aumento progressivo na porcentagem de células superficiais. No segundo dia de aplicação de eCG, houve predomínio de células basais e parabasais, porém, células intermediárias foram encontradas nos animais 2 (10%) e 4 (20%), fato que demonstrou uma evolução inicial acelerada do proestro.

No quarto dia, com exceção dos animais 4, 9 e 7, foi notada uma evolução do proestro, com aumento na porcentagem de células intermediárias, e até mesmo presença de células superficiais, nos animais 2 e 5.

Tabela 1. Valores percentuais referentes aos tipos celulares observados nas análises de citologia vaginal (CV), realizadas a cada 48 horas (dia 2 ao dia 12) após início da aplicação do protocolo de indução do estro em fêmeas caninas

	Animal 1						Animal 2						Animal 3					
	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12
B	60	-	-	-	-	-	B	70	25	-	-	-	B	10	-	-	-	-
PB	40	90	30	5	5	5	PB	10	50	-	-	-	PB	90	95	70	50	-
I	-	10	70	90	80	80	I	20	20	50	10	-	I	-	5	30	50	20
SN	-	-	-	5	15	15	SN	-	5	50	50	20	SN	-	-	-	-	80
SA	-	-	-	-	-	-	SA	-	-	-	40	80	95	SA	-	-	-	-

	Animal 4						Animal 5						Animal 6					
	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12
B	5	-	-	-	-	-	B	10	-	-	-	-	B	50	50	5	-	-
PB	65	60	-	-	-	-	PB	90	10	-	-	-	PB	50	50	25	25	10
I	30	40	80	-	-	-	I	-	70	-	-	-	I	-	-	70	50	30
SN	-	-	20	60	50	20	SN	-	10	20	10	-	SN	-	-	-	20	50
SA	-	-	-	40	50	80	SA	-	10	80	90	100	100	SA	-	-	-	5

	Animal 7						Animal 8						Animal 9					
	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12
B	90	90	-	-	-	-	B	10	-	-	-	-	B	20	20	10	-	-
PB	10	10	10	-	-	-	PB	80	-	-	-	-	PB	80	80	90	-	-
I	-	-	20	10	-	-	I	-	30	-	-	-	I	-	-	-	90	-
SN	-	-	20	30	30	20	SN	-	70	50	30	5	SN	-	-	-	5	60
SA	-	-	50	60	70	80	SA	-	-	50	70	95	95	SA	-	-	-	5

Tipos celulares: B = células basais, PB= parabasais, I= intermediárias, SN= superficiais nucleadas, SA= superficiais anucleadas ou com núcleo picnótico.

No sexto dia, destacaram-se os animais 5, 7 e 8, com presença precoce e considerável de células superficiais anucleadas no esfregaço, 80%, 50% e 50%, respectivamente. No dia 8, observou-se que os animais 1, 3 e 6 ainda apresentavam células parabasais no esfregaço vaginal, sendo esse fato demonstrativo de uma evolução mais lenta do proestro. No dia 10, todos os animais já apresentavam células superficiais, com destaque para o animal 5, com 100% de células superficiais anucleadas no esfregaço. Por fim, no dia 12, com exceção do animal 1, todos apresentavam 100% de células superficiais, variando apenas a porcentagem de células superficiais anucleadas ou com núcleo picnótico. De fato, Johnston, Kustritz e Olson (2001) citaram que a porcentagem máxima de cornificação celular, que reflete

a máxima estimulação estrogênica, está entre 80 e 90% na maioria dos animais. Ainda, segundo esses autores, o tipo e a intensidade da coloração podem contribuir para que as células superficiais tenham aparência anucleada.

Avaliando, portanto, as características da citologia vaginal, influenciadas pela indução hormonal exógena, pode-se concluir que houve indução de proestro em todos os animais, porém, com intensidades de progressão diferenciadas. Considerando que o início do estro coincide com a máxima cornificação celular, pode-se afirmar que, até o dia 12, o animal 1 ainda não havia entrado em estro, sob o aspecto da citologia vaginal.

Realizando indução de estro em protocolo semelhante ao utilizado no presente estudo, England & Allen (1991) avaliaram

comparativamente a repetibilidade de alguns eventos em um grupo de cadelas submetidas à indução do estro com 20 UI de eCG (uma vez ao dia por 5 dias) e 500 UI de hCG (no quinto dia) e em grupo de animais em estro espontâneo. Os autores descreveram as alterações de citologia vaginal e encontraram que o pico de cornificação celular se deu mais precocemente nos animais submetidos à indução do estro, comparativamente aos animais em estro natural. Os dados do presente estudo corroboram em parte com o aspecto citado, pois apesar de os animais 2, 4, 5, 7 e 8 já apresentarem presença de células superficiais anucleadas por volta do dia 6 após início da aplicação do protocolo, o pico de cornificação não se deu

precocemente. Com base nesse fato, pode-se afirmar que os animais do presente estudo não apresentaram hiperestrogenismo decorrente de aplicações repetidas de eCG, o que difere dos achados ARNOLD et al. (1989).

A tabela 2 demonstra a concentração sérica de progesterona no 12º dia de indução de estro.

Pode-se observar que os animais 1, 3 e 4 apresentaram valores dentro do esperado, pois segundo Johnston, Kustritz & Olson (2001), valores séricos de progesterona entre 4-10/mL, indicam que a ovulação está ocorrendo, fato que se aplica ao momento de dosagem nos animais do presente estudo, 48 horas após aplicação de hCG.

Tabela 2. Valores de progesterona sérica (P₄), referente ao 12º dia após início da aplicação de protocolo de indução de estro, em fêmeas caninas

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9
P ₄ (ng/mL)	5,2	15,4	9,4	7,5	26,5	17,8	19,8	14,5	17,9

A cadela é a única fêmea doméstica que apresenta elevação na concentração sérica de progesterona 2-3 dias antes da ovulação. A concentração de progesterona permanece menor que 1 ng/mL durante o anestro e maior parte do proestro. Os valores aumentam rapidamente, acima de 1 ng/mL, antes e durante o pico pré-ovulatório de LH (CONCANNON et al., 1989). No presente estudo, a aplicação de hCG foi realizada no 10º dia de indução, mimetizando o pico pré-ovulatório de LH.

Os outros seis animais apresentaram níveis séricos de progesterona acima do esperado, pois, como descrito por Concannon et al. (1989), picos de 15 a 90 ng/mL ocorrem apenas por volta de 15 a 30 dias após o pico de LH, e, no presente estudo, a aplicação de hCG havia sido realizada há apenas 48 horas. Esse fato demonstra um processo de luteinização pré-ovulatória exacerbado. Essa observação destoa das descrições de England & Allen (1991), que

afirmaram que a concentração sérica de progesterona foi sempre menor nos animais em estro induzido, comparando-se aos animais em estro natural, podendo ser essa uma das causas das baixas taxas de prenhes. Embora, na presente pesquisa, tenha-se encontrado níveis elevados de progesterona, cabe ressaltar que não foi avaliado o tempo de persistência desses valores e, portanto, não se pode inferir sobre nenhum efeito positivo em taxas de prenhes, mas se pode afirmar que os valores séricos de progesterona encontrados nos animais 2, 5, 6, 7, 8 e 9 não estão em consonância com os achados de citologia vaginal. A análise macroscópica ovariana evidenciou uniformidade de coloração (hemorrágica) e de característica de superfície (irregular) e os dados registrados na Tabela 3 permitiram concluir que o protocolo utilizado foi efetivo na promoção do crescimento folicular e ovulação.

Com exceção do animal 1, que apresentou a menor taxa de progesterona, todos os animais apresentaram folículos rompidos, ou seja, ocorrência de ovulação e, ainda, a grande maioria apresentou presença de corpo hemorrágico. Assim, no contexto do presente estudo, pode-se afirmar que houve correspondência entre os valores de progesterona encontrados e os achados de macroscopia ovariana.

Quanto às alterações uterinas, apenas o animal 6 apresentou secreção intra-uterina, demonstrando que o protocolo utilizado não causou efeitos negativos relacionados à hiperestimulação glandular uterina, o que poderia estar relacionado ao complexo hiperplasia-endometrial-piometra.

Tabela 3. Características macroscópicas de ovário (número de estruturas encontradas), por ocasião da ovariosalpingo-histerectomia, realizada no 12º dia após início da aplicação de protocolo de indução de estro, em nove fêmeas caninas

Nº de estruturas ovarianas	Animais								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Folículos túrgidos	07	05	04	02	11	05	12	11	15
Folículos rompidos	0	01	01	02	04	17	13	07	09
Corpos hemorrágicos	0	0	01	0	01	06	08	12	06
Corpos lúteos	0	0	0	0	0	0	0	03	0

Um achado interessante do presente estudo foi a característica do fluido folicular encontrado. Apesar do grande número de folículos ovulados, havia considerável número de folículos ainda não ovulados. Ao se proceder ao *slicing* (fatiamento) ovariano para a liberação de complexos cumulus-oócitos, notou-se que o fluido folicular apresentava aspecto não detectado em outros ovários, nas diversas fases do ciclo estral. Todos os folículos ovarianos das fêmeas do presente experimento apresentavam fluido folicular extremamente denso, viscoso, assemelhando-se a um gel aderente. O mesmo envolvia os oócitos, impedindo o isolamento desses. Esse aspecto permitiu inferir que essa característica de fluido folicular pode estar intrinsecamente relacionada às baixas taxas de fertilidade descritas na literatura, quando se induz o estro em cadelas, com o uso de gonadotrofinas. O fato de haver boa evolução na citologia vaginal, consideráveis níveis séricos de progesterona e ainda, altas taxas de crescimento folicular e ovulação reforça a

hipótese de que as baixas taxas de fertilização podem, também, estar relacionadas as alterações físicas e, até, bioquímicas do fluido folicular de fêmeas caninas submetidas à indução de estro com gonadotrofinas.

O desenvolvimento de um protocolo efetivo de indução do estro em cadelas é vantajoso, especialmente em estabelecimentos de criação de cães onde se faz necessário um contínuo suprimento de filhotes. Porém, os resultados obtidos com o uso desses protocolos diferem entre os trabalhos publicados, mesmo quando metodologias semelhantes são utilizadas. Esse fato pode ser uma consequência de alguns aspectos, entre eles, deve-se considerar o pequeno número de animais utilizados em alguns trabalhos, a utilização de animais em anestro determinado apenas através de citologia vaginal e comportamento, a não-distinção da fase do anestro (inicial ou tardio) em que os animais se encontram antes de serem submetidos à indução e, ainda, a utilização de animais em estado de anestro prolongado. Todos esses aspectos

contribuem para as divergências nos relatos de sucesso, ou seja, nas taxas de ovulação, prenhez e nascimentos (ENGLAND & ALLEN, 1991).

CONCLUSÕES

Pode-se afirmar que a utilização de gonadotrofinas é efetiva na indução do estro em cadelas, provocando alterações de citologia vaginal características de proestro com progressão para estro. Além da promoção de crescimento folicular e ovulação, altos valores séricos de progesterona e ausência de indução de alterações uterinas consideráveis são observados. Porém, notou-se a presença de fluido folicular de característica densa e viscosa, que pode se relacionar, pelo menos em parte, às baixas taxas de fertilidade descritas, até então, na literatura, quando do uso desses protocolos de indução.

REFERÊNCIAS

ARTHUR, G. H. Infertility in bitch and queen. In: ARTHUR, G. H. **Veterinary reproduction and obstetrics**. 7. ed. London: WB Saunder, 1996. p.536.

BOUCHARD, G. Seasonality and variability of the interoestrus interval in the bitch. **Theriogenology**, v.36, n.1, p. 41-50, 1991.

CONCANNON, P. W.; DIGREGÓRIO, G. B. Canine vaginal cytology. In: T. J. BURKE (ed). **Small animal reproduction and fertility**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986. p. 96-111.

CONCANNON, P. W.; MC CANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in

the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 39, p.3-25, 1989.

CONCANNON, P. W.; LASLEY, B.; VANDERLIP, S. LH. Release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrus dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.51, p.41-54, 1997.

ENGLAND, G. C. W.; ALLEN, W. E. Repeatability of events during spontaneous and gonadotrophin-induced oestrus in bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, n.2, p.443-448, 1991.

FAIR, T. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embriology**. v. 195, p.327-336, 1997.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canide and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997. Cap. 30, p. 734-739.

HASE, M. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dog. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 62, n.3, p.243-248, 2000.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Incidence of oocyte nuclear maturation within the ovarian follicle of the bitch. **Veterinary Record**, v.143, p.590-591, 1998.

HEWITT D. A.; WATSON, P. F.; ENGLAND, G. C. W. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v.9, p.1083-1128, 1998.

HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of

bitches. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.2, p.275-288, 1996.

JHONSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Sexual differentiation and normal anatomy of the bitch. In: JHONSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. v.1, p. 1-14.

JÖCHLE, W.; ANDERSEN, A. C. The estrous cycle in the dog: a review. **Theriogenology**, v.7, n.3, p.113-140, 1977.

KOOISTRA, H. S. Concurrents pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of estrous cycle and anestrus in beagle bitches. **Biology of Reproduction**, v.60, n.1, p.65-71, 1999.

LEAVIT, W. W.; BOSLEY, C. G.; BLAHA, G. C. Source of ovarion preovulatory progesterone. **Nature New Biology**, v.234, n.52, p.283-284, 1971.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOZ, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, D. Effects of follicle size on bovine oocytes quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.48-53, 1994.

MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; PARAMIO, M. T. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes . **Theriogenology**, v.1, p. 969-980, 1994.

MIALOT, J. P. Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, p.34-40, 1988.

MOSES D. L.; SHILLE, V. M. Induction of estrus in greyhound bitches with prolonged idiopathic anestrus or with suppression of estrus after testosterone

administration. **Journal American Veterinary Medicine Association**., v.192, n.11, p.1541-1545, 1988.

MOTLIK, J.; FULKA, J. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. **Journal Experimental Zoology**, v.198, p.155-162, 1986.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v.48, p.769-774, 1997.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**, v.54, p.535-542, 2000.

ONCLIN, K. Patterns of circulating prolactin LH and FSH during dopamine-agonist induced termination of anestrus in beagle dog. . **Biology of Reproduction**, v.52, p.314, 1993.

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

SHILLE, V. M.; STABENFELDT, G. H. Current concepts on reproduction of the dog and cat. **Advances in Veterinary Science and Cooperative Medicine**, v.24, p.211-243, 1980.

SHILLE, V. M.; TATCHER, M. J.; LLOYD, M. L. Gonadotrophic control of follicular development and the use of exogenous gonadotrophins for induction of oestrus and ovulation in the bitch. **Journal Reproduction and Fertility**, v.39, p.103-113, 1989.

VERSTEGEN, J. Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in the dogs by administration of

purified pig LH. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.111, n.1, p.35-40, 1997.

VERSTEGEN, J. Hormonal cycle and vaginal cytology in the bitch. In: VERSTEGEN, J. **Reproduction Hos Hund**. Escandinávia: Frederinksberg Dansk Veterinaer forening for Husdyrreproduction., 1999, p. 7-21.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Maturation, fertilization and development of dog oocyte in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 46, n. 5, p.853-858, 1992.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 227-229, 1993.

WALLACE, S. S.; MAHAFFEY, M. B.; MILLER, D. M.; THOMPSON, F. N.; CHAKRABORT, P.K. Ultrasonic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. **American Journal Veterinary Research**, v. 53, n.2, p.209-215, 1992.

Data de recebimento: 08/08/2007

Data de aprovação: 24/10/2007