

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Efeitos da aplicação do benzoato de estradiol na prevenção da gestação em
cadelas

Ana Augusta Pagnano Derussi

Botucatu- SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Efeitos da aplicação do benzoato de estradiol na prevenção de gestação em
cadelas

Ana Augusta Pagnano Derussi

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Profa. Adj Maria Denise

Nome da Autora: Ana Augusta Pagnano Derussi
Título: Efeitos da aplicação do benzoato de estradiol na prevenção de gestação em cadelas

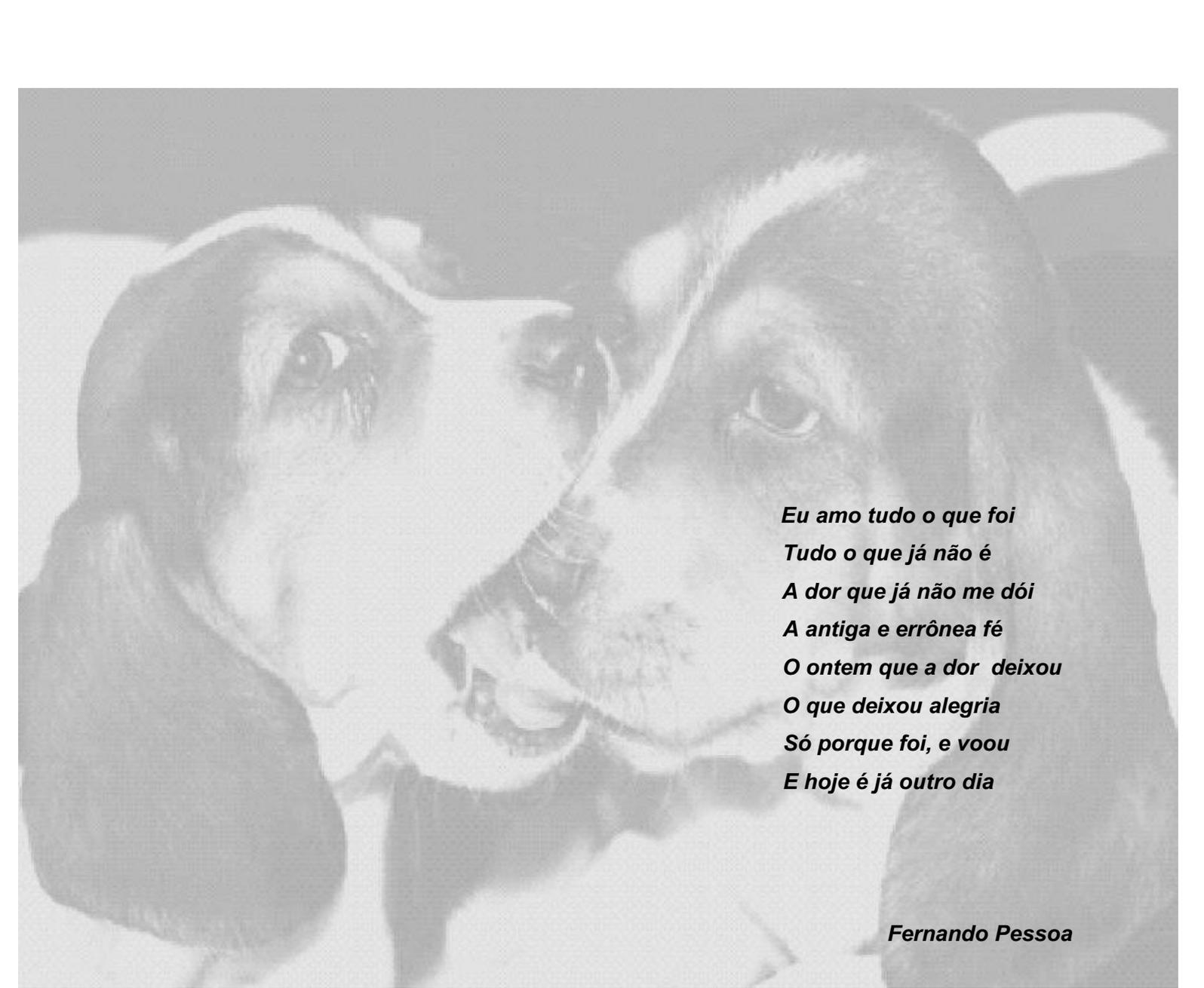
COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Adj Maria Denise Lopes
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profª Adj. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profª Dra. Camila Infantsi Vannucchi
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – São Paulo

Data da Defesa: 23 de janeiro de 2008



*Eu amo tudo o que foi
Tudo o que já não é
A dor que já não me dói
A antiga e errônea fé
O ontem que a dor deixou
O que deixou alegria
Só porque foi, e voou
E hoje é já outro dia*

Fernando Pessoa



*Mesmo quando tudo pede um pouco mais de calma
Mesmo quando o corpo pede um pouco mais de alma
Eu sei, a vida não para*

*Enquanto o tempo acelera e pede pressa
Eu me recuso faço hora vou na valsa
A vida é tão rara*

*Até quando o corpo pede um pouco mais de alma
A vida não para*

*Enquanto todo mundo espera a cura do mal
E a loucura finge que isso tudo é normal
Eu finjo ter paciência
O mundo vai girando cada vez mais veloz
A gente espera do mundo e o mundo espera de nós*

*Um pouco mais de paciência
Será que é o tempo que lhe falta pra perceber
Será que temos esse tempo pra perder
E quem quer saber
A vida é tão rara*

*Mesmo quando tudo pede um pouco mais de calma
Mesmo quando o corpo pede um pouco mais de alma
Eu sei, a vida não para (a vida não para não)*

*Será que é tempo que me falta pra perceber
Será que temos esse tempo pra perder
E quem quer saber
A vida é tão rara*

*Mesmo quando tudo pede um pouco mais de calma
Até quando o corpo pede um pouco mais de alma
Eu sei, a vida não para...a vida não para*

Lenine- Paciência

Dedicatória

Aos meus pais, Tarciso Derussi e Edith Maria Pagnano Derussi, pelo apoio, compreensão, cuidados dedicados por toda vida”

Aos meus tios Paulo Múcio Guimarães Pagnano (*in memoriam*) e Rubens Cláudio Guimarães Pagnano (*in memoriam*), por terem sido exemplos de figuras humanas em minha vida.

Aos animais que enriqueceram imensamente minha vida, meus erros, meus sucessos e minha profissão.

Agradecimentos

À professora, conselheira, amiga e orientadora Maria Denise Lopes, por todo auxílio, críticas, exemplo, confiança, oportunidade e paciência durante todo este período. Obrigada por tudo, sempre.

À professora Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, pelo grande auxílio na efetivação deste experimento, pelos esclarecimentos, pelo convívio e pelo espaço cedido no Laboratório de Fertilização *in vitro* do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro (bolsa de mestrado) na elaboração desta tese.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Botucatu, em especial ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

À professora Maria Dalva Cesário, pela ótima convivência e pelo trabalho em conjunto com o Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências.

Aos docentes e residentes do Laboratório Clínico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Botucatu, pelas análises hematológicas necessárias à realização deste experimento.

À professora Eunice Oba, pelo espaço cedido no Laboratório de Endocrinologia, para análises necessárias.

Ao professor João Carlos Pinheiro Ferreira e o doutorando Gustavo Araújo pelo apoio, amizade e auxílios estatísticos na elaboração desta tese.

Aos professores Frederico Ozanam Papa, Cezinande de Meira, Marco Antonio Alvarenga, Nereu Carlos Prestes e Sony Dimas Bicudo pelos auxílios, amizade e bons momentos de convívio ao longo destes anos no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

À amiga e companheira de trabalho Viviane Helena Chirinéa, por todo auxílio, força, companheirismo, risadas nestes anos de convívio, nos momentos de trabalho, nas horas de festa e nas horas em que um colo familiar era necessário. Vivi e família Chirinéa, obrigada por tudo!

À amiga Fabiana Ferreira de Souza por todo seu auxílio, lanchinhos, calma e olhar materno na elaboração desta tese.

Ao amigo Yuri Karacas pelos serviços anestésico, bom humor e trabalho em equipe que foram cruciais na elaboração desta tese.

À amiga Ieda Dalla Pria, por sua personalidade e tamanho inconfundíveis, por nossa comunicação telepática, por toda sinceridade nestes anos de convívio, pelos domingos jogando conversa fora e pela compreensão nos momentos de alegria e de dor.

À amiga Bruna De Vita pelo companheirismo, amizade, risadas, tropeços e conversas nas longas madrugadas, divididas por todos esses anos de convivência.

À amiga Bethânia, que neste pouco tempo, mostrou-se uma amiga especial e excelente companheira de bancada, músicas, reclamações, teimosias, traduções e cafezinhos.

À amiga Christianne Silva Barreto, que mesmo com a distância, continua transmitindo seu melhores sentimentos, suas provas de amizade e de força, que me fazem ver Botucatu de uma forma diferente desde o momento que a conheci.

À minha amiga Cely, por sua boa vontade, bom humor e companheirismo.

À minha veterana Juliana Machado, por toda sua alegria e sinceridade nestes anos de convívio, regados a muitas conversas, cervejas e pasteis.

Aos meninos Moíses e Luis, por serem pessoas especiais e extremamente prestativas, bem humoradas e pacientes com as meninas do REPAS.

As meninas da Reprodução: Ana Izabel, Lílian Rigatto, Luciana Batalha, Luciana Leal, Jeanne, Giovanna, Fernanda, Daniela Montchiese, Carla Moia, Claudinha, Tatiana, Liane, Camila Bianco pela amizade, pelo bom convívio.

Aos meninos da Reprodução: Ian, Marcio, Duroc, Heder, Daniel, André, Wolf, Gabriel Felício, Thiago, Gabriel (Carioca), João, Coruja, Zé, Rodrigo, Rodolfo, Bruno e Leandro pelo convívio e bons momentos

Aos residentes de 2007 do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.: Gabriel, Rosiara, Carmo e Maria Clara. Por toda ajuda e compreensão na divisão do mesmo espaço. Obrigada pela amizade de hoje e sempre.

Aos residentes 2008 do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Thiago, Ana Carolina, Ana Cristina e Janaína pela ajuda e amizade neste período de convívio.

Aos amigos do Instituto de Biociências: Walter, Mariana, Anthony, Isabela e Diego, pelo apoio, senso de humor e animação constante.

Aos amigos, pós-graduandos e docentes dos demais Departamentos, pelos auxílios e assistência, em especial ao professor Alexandre Secorun Borges, por toda sua ajuda, nas intercorrências do experimento.

Às minhas amigas incondicionais: Simone Freitas Simões, Maria Veridiana Bonifácio e Luen Marauci Rubião, pela nossa amizade de infância e por todo aprendizado de vida, que muito contribuíram pra que eu seja a pessoa que sou hoje.

Aos meus queridos amigos sertanezinhos: Paulo, Du, Galo, Peterson e Foca, pelos nossos tantos anos de convivência, companheirismo, baladas, risadas e apoio em todos os momentos.

À extensa família Pagnano, tios, tias, primos e primas, pelo inconfundível apoio e união em momentos tão especiais em minha vida.

Aos funcionários da FMVZ: Cristina, Raquel, Cida, Edílson, Walter, Marcio, Tico (*in memoriam*) e seu Luis por todo auxílio e ajuda fundamental.

Aos funcionários a pós –graduação Denise, Maria e José Roberto por toda boa vontade e auxílio durante o período.

As cadelas Nina, Sussa, Tim, Kiara, Paloma, Branca, Brisa, Madu, Mel, Radija, Tchuca, Sol, Mila, Lilica, Vitória, Lili, Kimba, Nega, Laila, Chica, Estrela, Fiona e Mabe, que participaram deste experimento e aos seus proprietários, pela confiança, colaboração e paciência na fase de experimentação.

Ao grande cão Boris (*in memoriam*) que muito contribui na realização deste experimento e pelo qual a saudade é enorme. À gata Brigitte, por todo seu afeto e sensibilidade e aos meus queridos cães, Bethânia, Yumi, Lilica, Dudu e Tina (*in memoriam*) pela alegria, força e amor incondicional, que abrandam as dificuldades cotidianas.

À Deus, essa força maior, por todos os momentos, pessoas e animais que fizeram parte de minha vida e que de certa forma contribuem para a alegria de hoje.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Dosagens das diferentes drogas comumente utilizadas em cadelas para a interrupção da gestação.....19
- Tabela 2- Caracterização dos grupos experimental e controle com relação a cobertura natural ou Inseminação Artificial (I.A). Botucatu, 2008...22
- Tabela 3- Determinação da onda pré-ovulatória de LH (Dia 0) baseada na porcentagem de células superficiais no exame de citologia vaginal, dosagens de progesterona sérica identificadas no primeiro dia de consulta e tipo de manejo reprodutivo (I.A ou cobertura natural) adotado nos animais do grupo experimental (G1). Análise baseados nos critérios descrito por Feldman e Nelson (1996) e Johnston et al., (2001). Botucatu, 2008.....23
- Tabela 4- Determinação da onda pré-ovulatória de LH (Dia 0) baseada na porcentagem de células superficiais no exame de citologia vaginal, dosagens de progesterona sérica identificadas no primeiro dia de consulta e tipo de manejo reprodutivo (I.A ou cobertura natural) adotado nos animais do grupo experimental (G1). Análise baseados nos critérios descrito por Feldman e Nelson (1996) e Johnston et al., (2001). Botucatu, 2008.....25
- Tabela 5- Determinação da provável idade embrionária das cadelas dos grupos experimental (subgrupo Ia, Ib e Ic) e controle (subgrupo IIa, IIb e IIc) baseado no surgimento da onda pré-ovulatória de LH (Dia 0 do ciclo estral). Botucatu, 2008.....28

- Tabela 6- Valores de referência adotados para análise da clivagem embrionária, baseados em dados relatados por Concannon et al. (2000). Botucatu, 2008.....34
- Tabela 7- Valores da média e desvio padrão referentes à contagem das hemáceas, hemoglobina, volume globular, proteínas totais, contagem de plaquetas e contagem de leucócitos do grupo experimental (Gla)- aplicação 2 a 3 dias após a última cobertura, em três momentos **M1** (14 dias antes da aplicação da droga), **M2** (14 dias após a aplicação da droga) e **M3** (40 dias após a aplicação da droga) e valores de referência considerados. Botucatu, 2008..37
- Tabela 8- Valores da média e desvio padrão referentes à contagem das hemáceas, hemoglobina, volume globular, proteínas totais, contagem de plaquetas, leucócitos do grupo experimental (Glb)- aplicação 4 a 5 dias após a última cobertura, em três momentos **M1** (14 dias antes da aplicação da droga), **M2** (14 dias após a aplicação da droga) e **M3** (40 dias após a aplicação da droga) e valores de referência considerados. Botucatu, 2008.....38
- Tabela 9- Valores da média e desvio padrão referentes à contagem das hemáceas, hemoglobina, volume globular, proteínas totais, contagem de plaquetas, leucócitos do grupo experimental (Glc)- aplicação 6 a 7 dias após a última cobertura em três momentos **M1** (14 dias antes da aplicação da droga), **M2** (14 dias após a aplicação da droga) e **M3** (40 dias após a aplicação da droga) e valores de referência considerados. Botucatu, 2008.....38
- Tabela 10- Relação entre o número de corpos lúteos contados e estruturas (oócitos, embriões e estruturas sem condição de identificação) recuperadas em cadelas dos dois grupos estudados: experimental (GI) e controle (GII). Botucatu, 2008.....39

Tabela 11- Análise da migração embrionária realizada em cadelas em diferentes períodos: período A, cadelas tratadas 2 a 3 dias após a última cobertura, período B, cadelas tratadas 4 a 5 dias após a última cobertura, período C, cadelas tratadas 6 a 7 dias após a última cobertura. Botucatu, 2008.....	41
Tabela 12- Análise da clivagem de embriões obtidos em lavados uterinos de cadelas em diferentes períodos: período A, cadelas tratadas 2 a 3 dias após a última cobertura, período B, cadelas tratadas 4 a 5 dias após a última cobertura, período C, cadelas tratadas 6 a 7 dias após a última cobertura. Botucatu, 2008.....	42
Tabela 13- Análise da viabilidade ovocitária e embrionária observada em lavados uterinos de cadelas em diferentes períodos: período A, cadelas tratadas 2 a 3 dias após a última cobertura, período B, cadelas tratadas 4 a 5 dias após a última cobertura, período C, cadelas tratadas 6 a 7 dias após a última cobertura. Botucatu, 2008.....	43
Tabela 14-Contagem dos embriões com idade superior a 18 dias de fertilização em diferentes períodos: período A, cadelas tratadas 2 a 3 dias após a última cobertura, período B, cadelas tratadas 4 a 5 dias após a última cobertura, período C, cadelas tratadas 6 a 7 dias após a última cobertura. Botucatu, 2008.....	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-Eneagrama elaborado para determinação do dia da OSH em cadelas do Grupo Experimental e Controle	27
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Principais mudanças endócrinas durante o estro e gestação na cadela. Adaptação de Kustritz (2001)	11
Gráfico 2- Período de meia vida de diversas categorias de estradiol	14

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Procedimento da OSH	31
Figura 2-	Tubas uterinas e útero	31
Figura 3-	Citologia vaginal do animal C09, indicando presença de 80% de células superficiais que são indicativas da fase folicular do ciclo estral	29
Figura 4-	Citologia vaginal do animal C09, indicando mudança abrupta dos tipos celulares para células parabasais e intermediárias indicativa da fase luteal do ciclo estral	29
Figura 5-	Identificação das tubas uterinas.....	31
Figura 6-	Separação e secção dos cornos uterinos	31
Figura 7-	Ovário e tuba uterina de cadela do grupo experimental	31
Figura 8-	Cornos uterinos de cadela do grupo experimental	31
Figura 9-	Ovário e tuba uterina de cadela do grupo controle	31
Figura 10-	Cornos uterinos de cadela do grupo controle	31
Figura 11-	Lupa estereomicroscópica	32
Figura 12-	Ovócitos classificadas como grau III	32
Figura 13-	Mórula	32
Figura 14-	Blastocisto inicial	32

Figura 15-	Blastocisto expandido	32
Figura 16-	Blastocisto eclodido	32
Figura 17-	Ovócitos corado com Hoescht e iodeto de propídio	33
Figura 18-	Mórula corada com Hoescht e iodeto de propídio	33
Figura 19-	Blastocisto inicial corado com Hoescht e iodeto de propídio.....	33
Figura 20-	Blastocisto expandido corado com Hoescht e iodeto de propídio	33
Figura 21-	Blastocisto eclodido corado com Hoescht e iodeto de propídio	33
Figura 22-	Útero da cadela E12 (grupo experimental).....	35
Figura 23-	Corno uterino da cadela E12.....	35

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Fertilização.....	03
2.2 Desenvolvimento embrionário.....	05
2.3 Endocrinologia da gestação canina.....	08
2.4 Drogas Abortivas	11
3 OBJETIVO.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Seleção dos animais.....	21
4.2 Ovariosalpingohisterectomia	26
4.3 Determinação do dia da OSH	26
4.4 Exames de citologia vaginal.....	28
4.5 Dosagem de progesterona sérica.....	29
4.6 Hemograma completo.....	29
4.7 Coleta de estruturas ovocitárias e embrionárias.....	30
4.8 Viabilidade ovocitária e embrionária.....	33
4.9 Comportamento migratório dos embriões.....	34
4.10 Clivagem embrionária.....	34
5.0 Implantação embrionária	35
5.1 Análise Estatística	36
6 RESULTADOS	36
6.1 Análise hematológica	37
6.2 Recuperação ovocitária e embrionária.....	39
6.3 Migração embrionária.....	40
6.4 Clivagem embrionária.....	42
6.5 Viabilidade ovocitária e embrionária.....	43
6.6 Implantação embrionária.....	44
7 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	45

8	CONCLUSÃO.....	59
9	REFERÊNCIAS.....	60
10	TRABALHO CIENTÍFICO.....	69

DERUSSI, A.A.P. **Efeitos da aplicação do benzoato de estradiol na prevenção de gestação em cadelas.** Botucatu, 2008. 99 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do benzoato de estradiol na prevenção de gestação em cadelas recém-acasaladas. Utilizou-se 24 fêmeas: **GRUPO I (Experimental)** – 12 cadelas que receberam uma única aplicação de benzoato de estradiol, dose de 0,2 mg/Kg, via intramuscular, entre o 2º e 7º dia da data da última cobertura. **GRUPO II (Controle)**- 12 cadelas que receberam solução oleosa diluente, dose de 0,2 ml/Kg, via intramuscular, entre os dias 2 e 7 da última data de cobertura. A ovariectomia (OSH) foi realizada entre os dias 6 a 16 após a última cobertura e foram avaliadas: taxa de recuperação e degeneração ovocitária/ embrionária; viabilidade embrionária e a influência do fármaco sobre a migração, clivagem e implantação embrionária. Foi examinado, também, os efeitos do benzoato de estradiol no sistema hematológico após a utilização da droga. Para avaliação dos hemogramas foi realizada análise de variância –ANOVA ($p < 0,05$) para medidas repetidas e o teste de Tukey para os parâmetros hematológicos. Para as variáveis recuperação ovocitária e embrionária foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson; para migração embrionária e clivagem embrionária foi realizado o teste de qui-quadrado, na análise de viabilidade embrionária foi utilizado teste exato de Fisher e na análise da implantação foi utilizada análise descritiva dos dados. Todos os testes foram realizados a 5% de nível de significância. Obteve-se 03 embriões no grupo experimental e 52 no grupo controle; o benzoato de estradiol exerceu influência sobre o número de estruturas recuperadas, porém não influenciou a migração, clivagem e a viabilidade embrionária quando utilizado até o 7º dia após a cobertura. Não foi detectada a presença de vesículas embrionárias implantadas em ambos os grupos, porém, acredita-se que as OSHs foram realizadas precocemente, impossibilitando a verificação da atuação do fármaco sobre essa variável. Os parâmetros hematológicos mostraram diferença significativa em relação ao volume globular e hemoglobina 15 dias após a aplicação do fármaco, apenas nas cadelas que receberam a droga 4 a 5 dias após a última cobertura, no entanto, ao final do experimento todas as fêmeas apresentavam hemogramas normais.

Palavras- chave: benzoato de estradiol, prevenção, embriões, cadelas

DERUSSI, A.A.P. **Effects of estradiol benzoate on prevention of canine pregnancy.** Botucatu, 2008. 99 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

ABSTRACT

The purpose of this experiment was to evaluate the effects of the estradiol benzoate on the prevention of pregnancy in mismaning dogs. For that, 24 bitches were divided, in: **Experimental Group** - 12 bitches that has received a single application of the estradiol benzoate (dose of 0,2 mg/Kg, intramuscular application), in a 2 to 7° days after the last mating. **Control Group** - 12 bitches received an oily solution (dose of 0,2 mL/Kg, intramuscular application) on the same period (between 2 to 7 days after the last mating). Ovariohysterectomy (OSH) has performed, between days 6 and 16 after the last mating and the parameters evaluated were the recovery rate and the embryonic/ oocytary degeneration rate and the influence of the drug on the migration, the viability, clivage and embryonic implantation. The effect of the estradiol benzoate on the hematologic system after the use of the drug was also investigate. For the oocytary and embryonic recovery variables the coefficient of Pearson correlation was used, in the analysis of the embryonic migration and embryonic clivage a qui-square test was carried qui-square test, in the analysis of embryonic viability were used the Fisher's exact test were used and in the analysis of the implantation descriptive analysis o was used. All the tests used 5% of significance level. Three embryos in the experimental group and 52 embryos in the control group were acquired; estradiol benzoate did practise influences on the number of structures recovered, but, nor on the migration, clivage and embryonic viability, when used until the 7° day after the mating. There was no detection the presence of embryonic vesicles in both the groups, Apparently, OSHs were performed to soon for the detection of embryonic vesicle during implantation, disabling the verification on the atuation of this drug on this variable. In the hematologic variables, differences were observed differences in relation with the blood count and haemoglobin count, only in bitches that were received the drug on the 4 and 5 days after mating, however, at the end of this experiment, all the bitches were healthful, presenting a normal hemogram

Key- Words: estradiol benzoate, prevention, embryos, bitches

INTRODUÇÃO

Por muito tempo, as atitudes primárias de controle das populações de cães e gatos estiveram pautadas somente na captura e na eutanásia desses animais, entretanto, essas ações tradicionais, simplesmente eliminavam o excedente populacional, sem a preocupação de atuar diretamente no foco do problema.

Atualmente, o controle populacional ocorre em um período transicional na saúde pública veterinária, focando esses animais não apenas como potenciais zoonóticos, mas sim, como integrantes das famílias e comunidades, que pelo estreitamento de convívio e intensificação do vínculo entre seres humanos e animais, gerou um alto valor intrínseco agregado (GARCIA, 2006).

Recentemente foi sancionado o projeto de lei 12.916 (16 de abril de 2008) que proíbe a eutanásia em animais saudáveis em 645 municípios do estado de São Paulo, medida que de certa forma, atende as determinações da Organização Mundial da Saúde que sempre preconizou a esterilização de animais, conscientização na proteção e posse responsável.

Esta nova visão, no entanto, exige do ser humano uma atuação mais eficaz e direcionada ao foco do problema: a procriação animal sem controle e a falta de responsabilidade quanto à posse, propriedade ou guarda de um animal de estimação.

Crias indesejáveis sempre fizeram parte das grandes preocupações de proprietários de cães e gatos, no entanto, quando o assunto é contracepção, em especial o uso de anticoncepcionais, há um conflito e a discordância do uso desses fármacos, mesmo dentro da classe médica veterinária.

É fato que o uso indiscriminado de fármacos contraceptivos geram efeitos colaterais importantes, incluindo enfermidades do sistema reprodutivo ou até mesmo a morte do animal, porém, é notável que maiores informações à respeito dessas drogas também são necessárias, já que várias dessas drogas não definem claramente a fase do ciclo estral que devem ser utilizadas.

As categorias de drogas destinadas à interrupção da gestação e/ou abortamento na cadela têm seu mecanismo de ação dependente do estágio gestacional em que são utilizadas, a capacidade de gerar a morte fetal, da

absorção e/ou abortamento ou até mesmo a indução do parto (HOFFMAN, 2004).

Alguns estudos estão sendo realizados na tentativa de resgatar a popularidade do estrógeno exógeno como método de abortamento ou prevenção da implantação, pois por muitos anos esta medida era considerada ineficiente e insegura. Publicações recentes evidenciam o uso de baixas doses de estrógenos em cadelas acasaladas e demonstram resultados seguros e efetivos (LOFSTEDT, 2004; TSUTSUI, 2006).

A utilização do benzoato de estradiol na prevenção da implantação em cadela recém acasalada é uma forma de contracepção, que pode atuar de forma menos dispendiosa sobre o controle populacional dos cães, já que muitas vezes a implantação de um programa de controle animal através do uso de esterilização cirúrgica, além da alocação de recursos financeiros, técnicos e humanos, exige planejamento que englobe diagnóstico, ações preventivas, monitoramento, avaliação e dedicação permanentes, seguindo as exigências da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Pesquisa recente indica que em média 95% das cadelas reprodutivamente normais que são acasaladas em seu período fértil tornam-se gestantes (REYNAUD et al., 2006). O tempo relativamente longo de permanência dos ovócitos nas tubas uterinas, associado à longevidade da capacidade fecundante dos espermatozóides e o rápido transporte espermático nos cornos uterinos sugerem que um único acasalamento é suficiente para produzir uma gestação.

A utilização do benzoato de estradiol em cadela recém acasalada é uma forma de contracepção e estudos sobre a dose, efeitos colaterais, aplicação em momento adequado do ciclo estral, poderiam intensificar o uso desse hormônio e aumentar sua eficácia. O estudo sobre o uso correto deste fármaco tem como intenção facilitar a utilização do produto, contribuindo diretamente para controle populacional de cães, especificamente em casos de coberturas recentes não desejadas.

REVISÃO DE LITERATURA

O progresso na reprodução de pequenos animais tem gerado maior interesse no manejo gestacional de fêmeas caninas e felinas, tanto no sentido do acompanhamento da gestação, quanto na determinação de sua interrupção precoce. O maior conhecimento a respeito da fisiologia reprodutiva canina associado à disponibilidade de preparações farmacológicas hormonais têm contribuído para o controle e manipulação do ciclo estral destas fêmeas (CONCANNON, 2004).

Características reprodutivas como uma longa viabilidade gametogênica, ciclos ovarianos que envolvem variação na maturação ovocitária, período de fertilização prolongado, desenvolvimento embrionário lento e um período anterior à implantação particularmente demorado, fazem dos cães uma espécie com grande variação individual e tornam o controle sobre sua reprodução extremamente desafiador (CONCANNON e VERSTEGEN, 2005).

Fertilização

O processo de maturação ovocitária possui aspectos peculiares à espécie canina, pois diferentemente das demais espécies, os ovócitos caninos são liberados na porção inicial das tubas uterinas ainda em estado imaturo, não podendo, portanto, serem fecundados imediatamente após a liberação. Os ovócitos em estágio de vesícula germinativa (VG) são observados ainda cerca de 44 horas após a ovulação, ou seja, 2 dias após a onda pré-ovulatória de LH (LUVONI et al., 2006).

A extrusão do primeiro corpúsculo polar, resultante da metáfase I ocorre dentro de 44 a 48 horas da ovulação e o segundo corpúsculo polar é observado somente após a metáfase II, ou seja, 54 horas após a ovulação (LUVONI et al., 2006). A maturação nuclear nas cadelas ocorre apenas quando os ovócitos atingem a porção média das tubas uterinas, cerca de 48 a 72 horas das ovulações e neste momento identifica-se um elevado nível de progesterona na circulação (CONCANNON et al., 1989; REYNAUD et al., 2005).

O mecanismo de transporte espermático nos cães está relacionado a uma rápida propulsão dos gametas. Contrações vaginais e miométriais que

ocorrem durante o coito contribuem com este processo, já que, espermatozóides são encontrados nas tubas uterinas, cerca de 20 a 50 segundos, após o acasalamento (ENGLAND et al., 2006). O decréscimo da fertilidade espermática é observado cerca de 1 a 2 dias após esses gametas serem depositados no trato genital da fêmea, porém o número de espermatozóides férteis ainda permanece alto e são passíveis de fecundidade podendo sobreviver em média por 6 a 7 dias (CONCANNON, 2000; REYNAUD et al., 2006).

No momento da fecundação, os ovócitos secundários estão localizados na porção média a distal das tubas uterina (cerca de 60 horas após a ovulação) e possuem a zona pelúcida (ZP), como matriz extracelular, exercendo um importante papel durante a interação gametogênica e fertilização (DE LOS REYES e BARROS, 2000), já que, a identificação entre os gametas é realizada por moléculas complementares associadas a ZP e a membrana plasmática do espermatozóide (MOORE, 2001).

O processo da fecundação é caracterizado pela penetração do espermatozóide na ZP do ovócito, chegando ao espaço perivitelínico, proporcionando interação entre oolema e plasmalema na região apical do segmento equatorial do espermatozóide (MOORE, 2001). Este fenômeno é fundamentado na fusão dos pró-núcleos feminino e masculino e liberação do segundo corpúsculo polar, caracterizando a fertilização completa, formando o núcleo de uma nova célula embrionária, ou seja, o zigoto (CONCANNON, 2000; CONCANNON, 2004; REYNAUD et al., 2005; TSUTSUI et al., 2006).

O período de fertilização das cadelas é extremamente prolongado, ou seja, de aproximadamente 12 a 14 dias, no entanto, segundo Concannon (2004) e England et al., (2006), o ápice de fertilidade está compreendido entre o dia do surgimento da onda de LH, considerado como dia 0 (D0) do ciclo estral nas cadelas até o 5º dia após, pois nesse intervalo estão incluídos o pico hormonal de LH e a ovulação. Cinco dias após a ovulação, já se observa o declínio da viabilidade ovocitária, sendo que sete dias após a ovulação a chance de fertilização é considerada rara (CONCANNON, 2000; ENGLAND e CONCANNON, 2002). No entanto, as cadelas ainda podem ter ovócitos aptos a serem fecundados com até sete a oito dias após a ovulação e acasalamentos

após nove a 10 dias do pico de LH podem ainda ser férteis e resultar em gestação (CONCANNON, 2004; TSUTSUI et al., 2006).

Desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário é dividido em três períodos: período de desenvolvimento do ovócito fertilizado (2 a 17 dias), caracterizado pela presença do zigoto até a formação do blastocisto; período de desenvolvimento embrionário propriamente dito (19 a 35 dias), iniciado pelo processo de implantação do blastocisto até a completa organogênese e período de desenvolvimento fetal (35 dias ao nascimento), no qual, as características fetais são evidenciadas e ocorre um rápido crescimento fetal (PRETZER, 2008).

O início das clivagens ocorre por volta de 72 a 96 horas após as ovulações e segundo Tsutsui et al., (2006), os zigotos apresentam-se bipartidos na porção média distal da tuba uterina. Após 120 horas das ovulações, estas estruturas possuem diâmetro variando de 110 a 170 μm e permanecem um longo período na junção útero-tubárica (7 a 10 dias), quando comparados a demais espécies (3 a 4 dias) (PRETZER, 2008).

De acordo com Reynaud (2006), as clivagens prosseguem atingindo o estágio de oito células embrionárias, cerca de 124 a 288 horas após as ovulações e esta fase corresponde à ativação do genoma embrionário. Nessa etapa alguns embriões ainda estão envolvidos por uma camada de células do *cúmulus*. A divisão subsequente em 16 células ocorre na porção distal da tuba uterina e o embrião possui diâmetro variando de 188 a 200 μm , incluindo a ZP.

As mórulas já são visíveis, com 192 a 216 horas após as ovulações, 8,5 a 10 dias após as ovulações e permanecem acumuladas no segmento distal da tuba uterina, sendo dependentes da secreção local para garantir sua nutrição (TSUTSUI et al., 1989; SONGSASEN e WILDT, 2007). Embriões podem iniciar a entrada nos cornos uterinos, em estágio de 16 células, porém, mórulas ou blastocistos iniciais são as estruturas mais comumente encontrados adentrando ao útero (PRETZER, 2008).

Aparentemente, a clivagem embrionária de duas a 16 células ocorre mais rapidamente após a fertilização de ovócitos com maturação mais

avançada, quando comparado a de ovócitos também já maturados, porém, em uma fase menos avançada e segundo Concannon et al. (2001), este achado pode explicar, em parte, porque a duração da gestação é similar entre acasalamentos que ocorrem antes ou dias após a maturação ovocitária; também o fato do período entre as fertilizações ocorrerem com uma duração limitada de cinco a sete dias após a onda pré - ovulatória de LH, gera clivagens mais rápidas no período pré-implantação que tendem a tornar os estágios de desenvolvimento embrionários similares, antes de serem efetivamente implantados.

Com 10 a 12 dias após as ovulações, uma cavidade se desenvolve rapidamente no centro da mórula e é denominada de blastocele originando o blastocisto, caracterizado por conter em média 32 a 64 células. O blastocisto expandido já pode ser encontrado no 12º dia após as ovulações (REYNAUD et al., 2006).

A fase posterior do desenvolvimento embrionário é caracterizada pelo processo de gastrulação, ou formação das camadas germinativas. Nesse estágio, a simples camada formadora da blástula, é convertida em uma estrutura tri-laminar constituída externamente pelo ectoderma, camada média pelo mesoderma e uma camada interna denominada de endoderma (PRETZER, 2008). O diâmetro do blastocisto inicial é de 215 a 350 µm, chegando a 500 a 750 µm na fase de blastocisto expandido, porém podem atingir 1000 µm no estágio de blastocisto tardio (REYNAUD et al., 2005).

Entre os estágios de blastocisto inicial e expandido, ocorre uma diminuição da espessura da zona pelúcida, provavelmente por consequência de ação enzimática e movimentos embrionários. Os embriões entram no lúmen uterino e permanecem livres por um período variável de 12 a 17 dias após as ovulações; nesta fase, os embriões atingem um diâmetro de 2300 µm com ocorrência de migração trans-cornual (REYNAUD et al., 2005).

O blastocisto atinge 2500 µm, com 16 a 20 dias e sua conformação expandida dificulta sua passagem corpo uterino. Nesta fase, o blastocisto pode se apresentar sem a ZP, porém, a existência de uma ruptura da zona pelúcida devido à ação de enzimas proteolíticas que degradam essa estrutura ainda é pouco conhecida nos cães (REYNAUD et al., 2005).

Na maioria das espécies a migração uterina ocorre em 40% ou mais dos animais gestantes, principalmente quando o número de ovulações entre o ovário direito e esquerdo são diferentes. A migração embrionária uterina visa à distribuição fetal igualitária entre os cornos direito e esquerdo, permitindo o espaçamento equidistante entre os fetos, possibilitando o desenvolvimento embrionário normal (TSUTSUI et al., 2001).

A fase de ocorrência da implantação nas cadelas segundo Allen (1995), Concannon (2000), Reynaud et al., (2006), Gunzel-Apel (2008), Pretzer (2008) e Verstegen-Oclin e Verstegen (2008) ocorre 18 a 21 dias após as ovulações, ou seja, 20 a 23 dias da onda pré-ovulatória de LH.

Os cães são extremamente férteis, com uma taxa de fertilidade em torno de 95%. Essa fertilidade alta é devido provavelmente as coberturas poderem ocorrer tão cedo como 5 dias antes das ovulações ou tão tarde como 6 dias após as ovulações e também devido a sobrevida longa dos espermatozóides no útero (aproximadamente 7 dias) e os oócitos nas tubas uterinas (aproximadamente 7 a 8 dias, incluindo 5 dias após a maturação oocitária (CONCANNON et al., 2009)

Ainda de acordo com Concannon et al. (2009) o parto nas cadelas ocorre 65 dias \pm 1 dia após a onda pré-ovulatória de LH (D0), em média 63 dias após a ovulação, 64 dias após o tempo médio da primeira cobertura e 43 dias após a implantação.

O desenvolvimento embrionário inclui o período de tempo necessário para que as três camadas germinativas se diferenciem (PRETZER, 2008). A invasão endometrial se inicia por volta do 13º dia de gestação e é caracterizada pelo aparecimento de massas de sinciciotrofoblasto que penetram entre as células epiteliais maternas de forma crescente em direção ao perimétrio, espalhando-se pelo lúmen das glândulas endometriais.

Neste período compreendido entre 10 a 14 dias após a fertilização, reações inflamatórias locais, caracterizadas pelo aparecimento de edema, infiltração neutrofílica e linfocitária, com congestão já são notadas nos cornos e corpo uterino, indicando os possíveis locais de futura implantação (VERSTEGEN-ONCLIN e VERSTEGEN, 2008). Entre o 21º e 40º dia após a fertilização, cada embrião em crescimento adquire um formato esférico e durante esta fase já há uma pequena diferenciação anatômica. Até o 35º dia há

uma constrição entre cada vesícula embrionária e após este período com o crescimento dos embriões há uma expansão dessas constrições, de forma que as membranas corio-alantoídeas adjacentes entram em contato umas com as outras e ambos os cornos uterinos tornam-se uniformemente distendidos, permanecendo assim até o final da gestação (ALLEN, 1995).

O período de desenvolvimento fetal ocorre após a finalização da organogênese e nesta fase as características como pigmentação, crescimento dos pêlos e unhas, fechamento e fusão de pálpebras, formação do ouvido externo, alongamento corpóreo (principalmente entre 32º e 55º dia da fertilização), diferenciação entre cabeça, tronco, abdômen e uma diferenciação sexual já podem ser notados (LOFSTEDT, 2004; PRETZER, 2008).

A gestação pode variar de 57 a 72 dias quando se considera o intervalo entre cobertura e parto, porém, quando as ovulações ocorrem de 48 a 60 horas após a onda pré-ovulatória de LH, ou mais precisamente, quando a concentração plasmática de progesterona atinge 2ng/ml, o intervalo entre a ovulação e o parto parece ser constante, ou seja, em média de 64 dias (TSUTSUI et al., 2006). Da mesma forma uma grande variação na duração da gestação pode ser observada quando a contagem se inicia no primeiro dia de múltiplos acasalamentos ou na última cobertura de vários acasalamentos, os extremos encontrados diferem de até duas semanas (CONCANNON, 2000).

Endocrinologia da gestação canina

A integridade gestacional é mantida por uma interação delicada de hormônios do eixo hipotálamo-pituitário-gonadal associada a fatores placentários, imunológicos, parácrinos e autócrinos entre mãe e fetos (SCHAFER-SOMI, 2008).

A regulação dos corpos lúteos na fase do diestro, na cadela, é um processo dinâmico, baseado em uma inter-relação complementar entre hormônios, como a progesterona, prolactina, LH, estradiol e relaxina (VERSTEGEN-ONCLIN e VERSTEGEN, 2008).

A concentração plasmática de progesterona aparentemente é similar tanto em cadelas gestantes quanto nas não gestantes, porém é pouco elucidado o reflexo dessa concentração, tanto na função luteal, como no

próprio metabolismo hormonal. O curto período de elevação da progesterona plasmática e o declínio abrupto são considerados fisiológicos, desde que a concentração de progesterona aumente no final do proestro, apresenta um pico em torno do 20° ao 30° dia após o surgimento da onda pré-ovulatória de LH e declíneo, atingindo níveis basais em torno dos 60 a 70 dias. A quantificação de metabólitos da progesterona medida através de análise fecal é significativamente maior em animais gestantes, porém a metabolização periférica deste hormônio na região placentária, faz com que os níveis séricos permaneçam similares (VERSTEGEN-ONCLIN e VERSTEGEN, 2008).

A produção de progesterona durante a gestação é maior do que no ciclo não gestante, embora essa diferença não seja observada nas concentrações de progesterona periférica, devido a um aumento do metabolismo da progesterona e da diluição pelo aumento do volume e da distribuição plasmática o que poderia reduzir cerca de 25 % ou mais da concentração de progesterona circulante. Além disto, o clearance hepato biliar da progesterona é duas vezes mais alto em cadelas gestantes do que cadelas não gestantes (CONCANNON et al., 2009).

A progesterona é absolutamente imprescindível na manutenção da gestação nas cadelas, pois a secreção insuficiente deste hormônio influencia o desenvolvimento do corpo lúteo, podendo causar morte embrionária precoce mesmo que o processo de implantação tenha sido adequado (GUNZEL-APEL, 2008). Níveis abaixo de 2 ng/ ml geram uma insuficiência luteal, que segundo Tibold e Thuróczy (2008) podem ocasionar reabsorção ou morte fetal, principalmente durante a segunda metade da gestação.

A progesterona garante a diferenciação endometrial e secreção das glândulas endometriais, necessárias ao processo de gestação e adesão placentária. A supressão da contratilidade uterina também é auxiliada pela progesterona, devido a sua ação preventiva da atividade uterogênica do estrógeno, que apesar de diminuída no fim da fase estral é aumentada significativamente após 10° a 15° dias do surgimento da onda pré-ovulatória de LH (VERSTEGEN-ONCLIN e VERSTEGEN, 2008).

A contração uterina depende de um mecanismo hormonal resultante da interação complexa entre a actomiosina e o ATP, num meio iônico adequado. O estrógeno faz a síntese da proteína contrátil, auxiliado pela concentração de

actomiosina e do sistema adenosina trifosfatase (ATP) e o bloqueio progesterônico atua no potencial da membrana alterando o gradiente iônico, diminuindo a sensibilidade da célula miometrial ao estímulo contrátil, através do bloqueio dos canais de Ca^{++} (hiperpolarizando a membrana), bloqueando a condução da atividade elétrica de uma célula muscular à outra, impedindo a contratilidade, mantendo a gestação (CLARK e MARKAVERICH, 1988).

A secreção hormonal de FSH, LH e prolactina durante o período gestacional ainda não está completamente esclarecida, no entanto, sabe-se que a prolactina é extremamente requerida na gestação, principalmente no segundo terço gestacional, permanecendo elevada durante o final da gestação e lactação, enquanto a presença de LH é facultativa (VERSTEGEN-ONCLIN e VERSTEGEN, 2008). O corpo lúteo canino requer o suporte de hormônios luteotróficos, como o LH e prolactina, após o 18° dia de gestação, pois uma diminuição da concentração destes hormônios geram declínio das concentrações de progesterona nesta fase, o que pode gerar reabsorção fetal (KUSTRITZ, 2001).

Após o 25° dia de gestação ocorre aumento específico da gestação nas concentrações de prolactina, elevando a produção total de progesterona e prolongando a vida funcional do CL até o final da gestação. Não está completamente entendido se esta elevação de prolactina; específica da gestação é estimulada e mantida pela secreção de relaxina placentária que se inicia simultaneamente entre os dias 25 e 30 da gestação e persiste até o final da mesma (CONCANNON et al., 2009).

A relaxina é detectada especificamente em cadelas gestantes e está elevada próxima aos dias 21 a 24 do surgimento da onda pré-ovulatória de LH, permanecendo alta, até o final da gestação, diminuindo após o parto, mas ainda detectável até 30° dia de lactação (VERSTEGEN-ONCLIN e VERSTEGEN, 2008). Em ratas e coelhas, a secreção de relaxina é realizada por células luteais e iniciam a regulação luteal, já em porcas a associação deste hormônio com a prolactina estimula a secreção de progesterona, porém a relação deste hormônio em cadelas necessita de maiores estudos.

O papel do 17- β estradiol na regulação da função luteal ainda não está totalmente esclarecido. Segundo Verstegen-Onclin e Verstegen (2008), o aumento deste hormônio ocorre por volta do 10° ao 64° dia do diestro, se

mostrando mais elevado em animais gestantes, provavelmente originário do CL gestacional, desde que não se observa a mesma elevação na fase luteal de animais não gestantes. As principais modificações hormonais durante a fase do estro e da gestação da cadela encontram-se resumidos no gráfico 1.

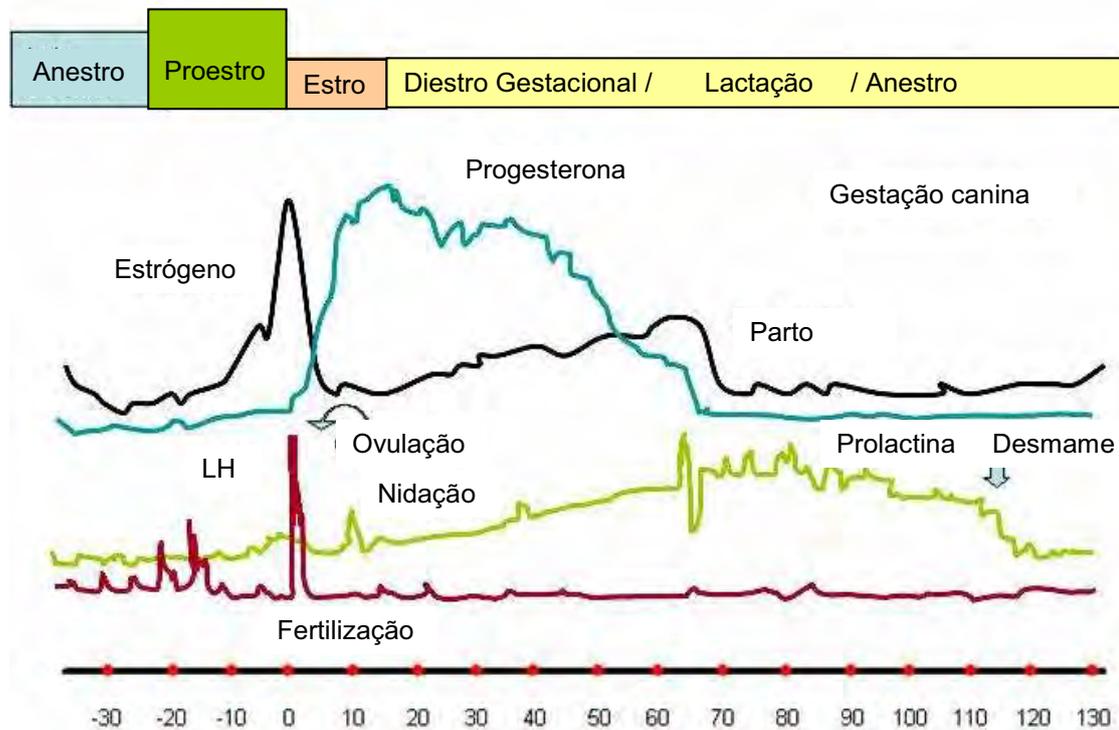


Gráfico 1. Modificações endócrinas durante o estro e gestação na cadela. Adaptação de Root Kustritz, M.V. Use of Supplemental Progesterone in Management of Canine Pregnancy. In: Concannon P.W., England G., Verstegen III J., et al. (Eds.), *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service. Gestação canina 01; Document No. A1220.0401.(Accessed: 25 Aug 2008).

Drogas abortivas

As razões que levam os proprietários de cães a optar pela interrupção da gestação são bastante variáveis. A causa mais comum é o acasalamento da fêmea com um macho não desejado, porém fatos como a prenhez no primeiro cio, anormalidades pélvicas, ou acasalamento com um macho de porte maior que a fêmea também fazem parte das justificativas (FELDMAN e NELSON, 2004).

O planejamento da interrupção da gestação da fêmea canina deve obedecer a alguns critérios, tais como: a confirmação da gestação ou da

possibilidade de ocorrência da cópula em período fértil, o uso de um fármaco eficaz, com ação em um curto período de tempo, a fácil administração, a ausência ou presença mínima de efeitos colaterais deste fármaco e a manutenção da fertilidade futura da fêmea, porém sem dispensar entretanto, a aplicação e o acompanhamento por um médico veterinário (FELMAN e NELSON, 2004).

Desde que a cópula tenha ocorrido dentro do período fértil do ciclo estral, existem várias alternativas para interromper uma possível gestação, porém informações a respeito das opções terapêuticas são necessárias, pois muitos medicamentos indicados para a interrupção da gestação, não definem claramente a fase do ciclo estral que devem ser utilizados. A falta de informações leva ao uso incorreto destes fármacos, gerando efeitos colaterais importantes, incluindo enfermidades do sistema reprodutivo ou até mesmo a morte do animal (SUTTON et al., 1997).

As categorias de drogas que são utilizadas para a interrupção da gestação na cadela têm seu mecanismo de ação dependente do estágio gestacional em que são utilizadas, a capacidade de gerar a morte fetal, absorção e/ou abortamento ou até mesmo a indução do parto (HOFFMAN, 2004). Dentre estas categorias destacam-se os esteróides, as gonadotrofinas e seus análogos, as prostaglandinas, os antiprogestágenos e os corticoesteróides (ROMAGNOLI e CONCANNON, 2003; GOBELLO, 2006).

A interrupção da gestação em seu terço inicial é discutível pela própria impossibilidade da confirmação da gestação antes da utilização do fármaco. Nesta fase ainda deve ser considerada a ação refratária natural do corpo lúteo à medicação exógena. As medicações recomendadas neste período incluem os estrógenos, prostaglandinas e inibidores de progesterona (FELDMAN e NELSON, 2004).

Os estrógenos endógenos são responsáveis pela hipertrofia uterina, pela produção de ferormônios, pela hipertrofia/ hiperplasia da mucosa vaginal, pela secreção das glândulas cervicais e pelo desenvolvimento mamário. Altas doses de estrógeno causam retroalimentação negativa no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano (HHO) suprimindo a secreção de gonadotrofinas, ao contrário, baixas dosagens de estrógeno elevam a secreção de FSH (JEFFCOATE, 1998).

Os estrógenos exógenos administrados logo após o acasalamento alteram a motilidade gametogênica e o microambiente tubárico levando a um retardo no transporte e à degeneração de oócitos. Além disso, alterações na relação estrógeno/ progesterona afetam ou atrasam o mecanismo de abertura da junção útero-tubárica e alteram os efeitos da progesterona no útero, incluindo desenvolvimento endometrial, secreção de proteínas e motilidade uterina, fato que prolonga a retenção dos embriões nas tubas uterinas, impedindo a migração para o útero. Podem, ainda, exercer um efeito tóxico direto sobre os embriões, interrompendo desta forma, a prenhez e induzindo ao relaxamento cervical (RASKIN, 1998; BRUNCKHORST et al., 2000; FELDMAN e NELSON, 2004),

Das categorias de estrógenos conhecidas, sabe-se que a estrona é duas vezes menos potente que o estradiol e possui forte ação estrogênica. O estradiol é dez vezes mais ativo que o estriol, pois possui maior afinidade e dissociação mais lenta com o receptor. O etinilestradiol é o sintético mais potente, pois possui absorção intestinal elevada e pequena metabolização na primeira passagem pelo fígado (CHUERY, 2008).

Em mulheres usuárias de estrógeno, para terapia de reposição hormonal (TRH), foi observada a ocorrência de hipertensão, trombose venosa e manifestações alérgicas, sendo que, a elevação da pressão arterial era rapidamente reversível com a interrupção da TRH. O retorno do sangramento vaginal também faz parte dos principais problemas da TRH e o desenvolvimento de câncer endometrial com uso de estrogênio é 2 a 8 vezes maior, porém o risco de vários graus de hiperplasia endometrial ainda é maior que o câncer de endométrio (CHUERY, 2008).

Os métodos de interrupção da gestação visam principalmente reduzir os níveis circulantes de progesterona, já que a gestação na cadela é dependente da atividade progesterônica do corpo lúteo. Nos estudos de Olson et al. (1989) foi relatada a regressão luteal com o uso de estrógenos (cipionato de estradiol) na primeira fase do diestro, no entanto, esse protocolo hormonal não se mostrou viável, já que nesse período, não há uma dependência do corpo lúteo aos hormônios hipofisários, ressaltando a hipótese de que os estrógenos atuariam de forma mais eficaz nas fases iniciais da gestação.

Estão disponíveis atualmente três diferentes categorias de estradiol, entre elas o benzoato de estradiol que se caracteriza por ser de meia vida mais curta (3 dias), o valerato de estradiol que possui meia vida mais longa, variando entre 7 a 9 dias e o cipionato de estradiol que se caracteriza por ter meia vida muito longa, variando entre 10 a 12 dias (gráfico 2).

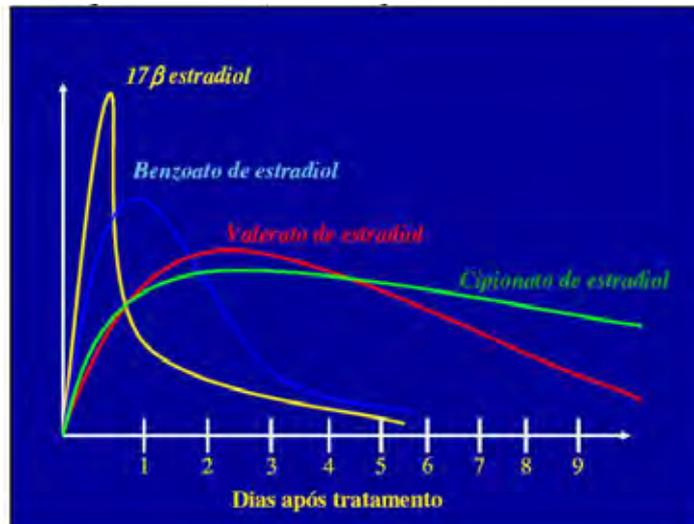


Gráfico 2: Período de meia vida de diversas categorias de Estradiol. Fonte: Boletim Informativo: Tecnopec. Uso de diferentes tipos de estrógenos na IATF. Disponíveis em: <http://www.tecnopec.com.br/index.php?aid=84>. acesso em 23 de agosto de 2008.

Nos estudos de Sutton (1995) foram utilizadas doses de benzoato de estradiol em cadelas que variavam de 05 a 10 mg/Kg em uma única aplicação, quatro dias após o último acasalamento. Posteriormente essa dose foi substituída por 0,3 mg/kg, não excedendo a 10mg/ animal entre 24 horas a 4 dias após as ovulações. Foi testada também, a dose de 0,01mg/kg no terceiro, quinto e sétimo dia da cobertura e esse protocolo foi considerado eficaz, porém associado a um prolongamento do comportamento estral. Estudos recentes recomendam a administração de 1-3 mg de benzoato de estradiol por animal ou 0,01 mg/kg, via subcutânea, em três aplicações em dias alternados a partir do primeiro ou segundo dia após a cobertura, ou no quinto, sétimo e nono dia após a cobertura ou ainda, a aplicação de 44 µg/kg de cipionato de estradiol durante o estro em dose única intramuscular (BRUNCKHORST et al., 2000).

Essas modificações de dosagens contribuíram para reduzir a dose total da droga em pequenos animais, na tentativa de minimizar os riscos de toxicidade, sem alterar a eficácia do produto. Alguns autores contra indicam o uso de estrógenos para a interrupção da gestação devido à ocorrência de seus

efeitos colaterais, como anemia aplásica da medula óssea, cistos ovarianos, endometrites e piometras (CONCANNON, 1995, FELMAN e NELSON, 2004).

A anemia aplásica da medula óssea é definida como a doença em que se observa falência de todas as linhagens de células sanguíneas, associada à citopenias e substituição da medula hipocelular por tecido adiposo (WEISS e KLAUSNER, 1990). A sensibilidade da medula óssea ao estrógeno ainda não é compreendida, mas sabe-se que a doses crescentes tanto de origem endógena como exógena principalmente de cipionato de estradiol causam danos a medula óssea (FELMAN e NELSON, 2004).

A anemia aplásica geralmente é fatal, pela ocorrência da pancitopenia, há uma imunossupressão crônica e anemia e os tratamentos geralmente são paliativos, gerando alto custo, tempo, frustração e muitas vezes resultando em eutanásia do animal (FELMAN e NELSON, 2004).

Em estudos realizados por Weiss e Klauner (1990), com relação a drogas associadas à ocorrência de anemia aplásica, verificou-se que a ação do estrógeno sobre a medula óssea realmente ocasiona alterações sanguíneas iniciais como trombocitopenia, anemia progressiva, leucocitose, porém essa supressão é transitória, pois com 30 a 40 dias após a aplicação, os parâmetros retornam ao normal, concluindo que os efeitos dos estrógenos são transitórios e que existe uma variação individual de sensibilidade ao estrógeno. É importante ressaltar que cães com diagnóstico definitivo de anemia aplásica, somente 0,033% possuem relação com aplicação anterior de algum tipo de droga e no caso do estrógeno as doses usadas geralmente estavam acima do recomendado como seguras (WEISS e KLAUNER, 1990).

A ocorrência de piometra cerca de uma a 10 semanas após a utilização de estrógeno é atribuída ao fato de que o fármaco, principalmente cipionato de estradiol e dietilbestrol, geram um aumento na sensibilidade de receptores de progesterona e aumentam a ligação da progesterona ao endométrio, gerando hiperplasia endometrial cística, porém a patogenia não é completamente elucidada, acredita-se que a fase de aplicação da droga interfira bastante na ocorrência desta doença (FELMAN e NELSON, 2004).

Estudos recentes, realizados por Schotanus et al., (2008) avaliaram uma cadela tratada com estrolium para incontinência urinária por um longo período e associaram a apresentação de secreção purulenta ao uso do fármaco. Outros

efeitos colaterais associados ao uso do estrolium incluíram alterações de comportamento, edema vulvar e mamário, raramente secreção vaginal sanguinolenta e rarefação pilosa, porém a ocorrência de anemia aplásica não foi relatada. As alterações comportamentais após o uso de estrógenos são relacionadas ao prolongamento da fase estral da fêmea por cerca de sete a 10 dias a mais que o normal (FELMAN e NELSON, 2004).

De acordo com Lofstedt (2004), pesquisas foram realizadas na tentativa de resgatar a popularidade do estrógeno exógeno, como método de abortamento, já que durante muitos anos este tratamento foi considerado ineficiente e inseguro. Publicações mais recentes entretanto, evidenciaram o uso de baixas doses de estrógenos em cadelas recém-acasaladas e têm demonstrado resultados seguros e efetivos (LOFSTEDT, 2004; TSUTSUI, 2006).

Tsutsui et al., (2006), utilizaram dosagens entre 0,025 a 0,2 mg/Kg de benzoato de estradiol no 5º dia da ovulação. A dose de 0,2 mg/kg foi considerada a dose de eficiência máxima, ou seja, a dose em que houve prevenção de 100% da gestação, sem a observação de efeitos colaterais. Foi verificado que nessa dose, os embriões encontravam-se degenerados com atraso de um dia na clivagem e com a migração embrionária mais lenta em relação ao grupo controle. A utilização do benzoato de estradiol na prevenção de gestação em cadela recém-acasalada é uma forma de contracepção, menos dispendiosa, que atua no controle populacional dos cães.

Estudos avaliaram a eficácia de uma nova categoria de drogas, os anti-estrogênicos, que são compostos sintéticos e não esteroidais que agem competitivamente com o estrógeno, sobre os seus receptores (GOBELLO, 2006).

Gobello (2006) explica esta dupla ação com relação à espécie em que é utilizada, órgão, tecido e tipo celulares alvos. São exemplos destes fármacos o clomifene e o citrato de tamoxifen, utilizado principalmente em mulheres no tratamento de infertilidade. Em animais, é um fármaco eficaz na prevenção ou término de gestação, quando administrados durante o proestro, estro ou diestro, apresentando efeitos semelhantes ao dos estrógenos, por agirem sobre o transporte do zigoto e/ ou implantação. Seus efeitos colaterais

estão associados à ocorrência de endometrites, piometra e cistos ovarianos (FELMAN e NELSON, 2004).

As prostaglandinas (PGF₂-α) possuem atividades luteolítica e espasmogênica causando o término da prenhez ou da fase luteal em cadelas não-prenhes (ROMAGNOLI et al., 1993). As PGF₂-α agem da seguinte forma : indução de uma vasoconstrição, reduzindo o aporte sanguíneo ao corpo lúteo e causando degeneração celular e interferência na síntese de progesterona e a ação direta no miométrio causando contração da sua musculatura (FELMAN & NELSON, 2004).

O tratamento com PGF₂-α logo após o acasalamento não é recomendado (FELDMAN e NELSON, 2004). Segundo Concannon et al., (2001) o corpo lúteo requer um suporte luteotrófico a partir do 18º dia de prenhez, portanto, o tratamento com prostaglandina será mais eficaz se realizado após o 25º dia de gestação, quando o corpo lúteo apresenta uma sensibilidade maior a sua ação. Entretanto, Romagnoli et al., (1991) demonstraram que doses elevadas de prostaglandinas podem interromper a gestação antes da implantação do embrião.

Os anti-progestágenos são esteróides sintéticos que se fixam com grande afinidade aos receptores da progesterona sem desencadear, entretanto os efeitos da progesterona. Administrados na fase inicial da gestação, inibem as modificações endometriais e as secreções uterinas necessárias à implantação do embrião, causando reabsorção embrionária (FIENI et al., 2001). Os sinais de aborto, apresentam-se semelhantes à ocorrência de um parto, com secreção vaginal podendo ser persistente por 3 a 5 dias (GOBELLO, 2006). O uso deste fármaco torna o tratamento extremamente dispendioso, principalmente quando realizado em cadelas de porte médio à grande, devido ao alto custo do produto.

O mifepristone e o aglepristone são exemplos de anti-progestágenos existentes no mercado que podem ser usados tanto na indução do parto quanto na interrupção da gestação. Alguns animais apresentam como efeitos colaterais um grau moderado de anorexia, depressão e congestão das glândulas mamárias (CONCANNON, 1995).

A utilização de fármacos com ação abortiva no segundo terço da gestação, é vantajoso devido à possibilidade de se diagnosticar a gestação

antes da utilização da droga. Nesse caso o aborto pode ser induzido com prostaglandinas (naturais ou sintéticas) e agentes inibidores da prolactina ou anti-serotoninérgicos como a metergolina (FELDMAN e NELSON, 2004).

Os agonistas de dopamina são utilizados na interrupção da gestação, após o 30° dia de prenhez, por serem fármacos que promovem redução de prolactina. A bromocriptina e a cabergolina são exemplos desta categoria de droga (CHUERY et al., 2008). O uso da bromocriptina não é licenciado no Brasil, para uso em animais, porém, seus efeitos incluem inapetência, anorexia e vômitos. Essa droga é 100% eficiente para promover aborto e o tratamento deve ser realizado antes do 40° dia de gestação. A cabergolina também atua como inibidor da prolactina gerando decréscimo nas suas concentrações séricas e ação abortiva mais eficaz no final da gestação, porém trata-se de uma medicação extremamente dispendiosa (FELDMAN e NELSON, 2004).

No último terço gestacional, já há a calcificação das estruturas esqueléticas fetais e neste caso o aborto é associado com a expulsão fetal e a realização do parto prematuro. De acordo com Feldman e Nelson (2004) é recomendado o uso de alguns fármacos no início desta fase (cerca de 30 a 35 dias do início do diestro ou do último acasalamento).

As dosagens das diferentes drogas mais comumente utilizadas em cadelas para promover a interrupção da gestação encontram-se na tabela 7.

Tabela 1: Dosagens das diferentes drogas utilizadas em cadelas para promover a interrupção da gestação

Droga	Princípio Ativo	Dose recomendada
Estrógenos	Dietilbestrol	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mg/Kg SID ou BID até 5 dias após o acasalamento
	Cipionato de Estradiol	<ul style="list-style-type: none"> • Dose total de 0,25 até no máximo 1 mg • 0,02- 0,04 mg/Kg ate 3 dias após o acasalamento
	Benzoato de Estradiol	<ul style="list-style-type: none"> • 0,20 mg/Kg SID até 7 dias após a cobertura • 3 a 7 mg /Kg ate 10 dias após o acasalamento • 0,2 a 1 mg/Kg total (não excedendo 1 mg/ animal), dividindo em 2 a 3 aplicações SUC com intervalo de 48 horas até no máximo 4 dias após o acasalamento • 0,5 a 3 mg total dividido em 3 aplicações até 4 dias após o acasalamento
Anti-estrogênicos Prostaglandinas	Citrato de tamoxifen	<ul style="list-style-type: none"> • 1 mg/Kg BID por 10 dias
	Lutalyse	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 mg/ Kg SC TID por 2 dias ou 0,25 mg/Kg BID
Antiprogestágenos	Cloprostenol	<ul style="list-style-type: none"> • 0,01 a 0,04 mg / Kg Sc ou intravaginal, dose única • 0,1 a 0,2 mg/ Kg SUC SID por 5 a 7 dias, 30 dias após o acasalamento
	£-prostol	<ul style="list-style-type: none"> • 20 ug/ Kg SID ou BID, por 5 dias após o décimo dia do diestro
	mifepristone	<ul style="list-style-type: none"> • 2,5 mg/ Kg BID por 4 a 5 dias após o trigésimo segundo dia da gestação
	aglepristone	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mg/ Kg em duas aplicações com intervalo de 24 horas
	epostane	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mg/dia VO por 7 dias do início do diestro
Agonistas de dopamina	Bromocriptina	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 mg/Kg/ dia VO por 6 dias iniciando no trigésimo quinto dia de gestação • 0,03 mg/ Kg VO BID, por 4 dias começando no quadragésimo dia da gestação
	Cabergolina	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 mg/ Kg SID até 40 dias após do surgimento da onda pré-ovulatória de LH • 0,165 mg/ Kg em dias alternados, por 5 dias após 40 dias do surgimento da onda pré-ovulatória de LH

OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho fundamentou-se em avaliar os efeitos do benzoato de estradiol na prevenção da implantação embrionária nas cadelas, auxiliando desta maneira o controle populacional desta espécie.

O objetivo específico constituiu -se em avaliar os seguintes parâmetros:

- Taxa de recuperação e degeneração ovocitária e embrionária após a terapia com benzoato de estradiol
- Viabilidade, classificação do estágio de desenvolvimento e comportamento migratório dos embriões das tubas uterinas para o útero após a terapia estrogênica
- Verificação de implantação embrionária após a terapia estrogênica
- Alterações hematológicas decorrentes da aplicação do benzoato de estradiol.
- Relação da eficiência do protocolo hormonal com o período de aplicação da droga.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS), no Laboratório de Fertilização *in vitro* (FIV) e no Laboratório de Endocrinologia da Reprodução do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Botucatu.

Seleção dos animais

Todas as cadelas foram inicialmente submetidas a um exame clínico geral, ginecológico completo e exame de citologia vaginal para a confirmação da fase do ciclo estral. Após os exames foram coletadas amostras sanguínea para realização de hemograma completo e dosagem de progesterona sérica. De posse dos resultados do hemograma completo, apenas as fêmeas que possuíam hemograma considerado normal eram selecionadas.

Foram utilizadas 12 cadelas, sem raça definida, com idade entre um e oito anos, atendidas no Ambulatório de Reprodução de Pequenos Animais, com histórico de coberturas recentes (entre 2 a 7 dias) não desejada pelo proprietário. Outras 12 fêmeas, foram atendidas ainda na fase folicular do ciclo, sem histórico de cobertura; nesses animais foi realizada inseminação artificial (I.A.), intravaginal e com sêmen fresco. Essas cadelas foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos, que continham portanto, tanto fêmeas em que foram realizadas a I.A como fêmeas que passaram pelo processo de monta natural (tabela 2)

O macho utilizado como doador de sêmen foi um cão treinado para a coleta manual e rotineiramente usado em outros experimentos no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS), com fertilidade comprovada. O protocolo de I.A. utilizado nessas fêmeas foi: duas I.A, com intervalo de 48 horas, nos dias D4 e D6 da onda pré-ovulatória de LH. A dose inseminante foi aproximadamente de 330×10^6 espermatozóides móveis. Após esse procedimento as cadelas foram distribuídas em 2 grupos:

GRUPO I (Experimental) – 12 cadelas que receberam uma única aplicação de benzoato de estradiol na dose de 0,2 mg/Kg (Estrogin[®])¹, por via intramuscular, no período compreendido entre o 2º ao 7º dia da data da última cobertura. Este grupo foi subdividido em:

- **grupo Ia-** 4 cadelas que receberam benzoato de estradiol na dose de 0,2 mg/Kg, por via intramuscular, no período **entre o 2º e 3º dia** da data da última cobertura
- **grupo Ib-** 4 cadelas que receberam benzoato de estradiol na dose de 0,2 mg/Kg, por via intramuscular, no período **entre o 4º e 5º dia** da data da última cobertura
- **grupo Ic-** 4 cadelas que receberam benzoato de estradiol na dose de 0,2 mg/Kg, por via intramuscular, no período **entre o 6º e 7º dia** da data da última cobertura

GRUPO II (Controle)- 12 cadelas que receberam solução oleosa diluente, na dose de 0,2 ml/Kg, por via intramuscular, entre os dias 2 a 7 da última data de cobertura. Esse grupo também foi subdividido em:

- **grupo IIa** - 4 cadelas que receberam solução oleosa diluente, na dose de 0,2 ml/Kg, por via intramuscular, no período **entre o 2º e 3º dia** da data da última cobertura
- **grupo IIb** – 4 cadelas que receberam solução oleosa diluente, na dose de 0,2 ml/Kg, por via intramuscular, no período **entre o 4º e 5º dia** da data da última cobertura
- **grupo IIc** - 4 cadelas que receberam solução oleosa diluente, na dose de 0,2 ml/Kg, por via intramuscular, no período **entre o 6º e 7º dia** da data da última cobertura.

¹ Estrogin[®], Farmavet Produtos Veterinários, São Paulo

Tabela 2- Caracterização dos grupos experimental e controle com relação a cobertura natural ou Inseminação Artificial (I.A). Botucatu, 2008.

Grupo Experimental	Manejo reprodutivo adotado	Grupo controle	Manejo reprodutivo adotado
E01	Cobertura natural	C01	I.A
E02	I.A	C02	I.A
E03	I.A	C03	Cobertura natural
E04	Cobertura natural	C04	Cobertura natural
E05	I.A	C05	Cobertura natural
E06	I.A	C06	Cobertura natural
E07	Cobertura natural	C07	Cobertura natural
E11	I.A	C09	I.A
E08	Cobertura natural	C10	I.A
E09	Cobertura natural	C11	I.A
E10	I.A	C12	I.A
E13	Cobertura natural	C13	I.A
Total de cadelas do grupo experimental	12	Total de cadelas do grupo controle	12
I.A	6	I.A	7
COBERTURA NATURAL	6	COBERTURA NATURAL	5

A porcentagem de células superficiais no exame de citologia vaginal e as dosagens de progesterona sérica foram os dois critérios utilizados para a determinação da onda pré-ovulatória de LH (Dia 0 do ciclo estral) e encontram-se descritos nas tabelas 3 e 4:

Tabela 3- Determinação da onda pré-ovulatória de LH (Dia 0) baseada na porcentagem de células superficiais no exame de citologia vaginal, dosagens de progesterona sérica identificadas no primeiro dia de consulta e tipo de manejo reprodutivo (I.A ou cobertura natural) adotado nos animais do grupo experimental (G1). Análise baseados nos critérios descrito por Feldman e Nelson (1996) e Johnston et al., (2001). Botucatu, 2008.

Grupo Experimental	Data	% células superficiais	Progesterona (ng/ml)	Previsão dia da onda pré-ovulatória de LH em relação a citologia vaginal e dosagem e progesterona	Manejo reprodutivo adotado
E01	19/ago	17.00%	20,11	[Dia +4 a +8]	Cobertura natural
E02	12/mar	100%	27,01	[Dia -2 a +8]	I.A
E03	16/mar	92.0%	1,63	[Dia -4 a +1]	I.A
E04	27/mar	95.0%	33,04	[Dia +7 a +8]	cobertura natural
E05	03/abr	90.0%	5,78	[Dia 0 a +3]	I.A
E06	11/abr	100%	3,13	[Dia -2 a +2]	I.A
E07	06/abr	100%	0,94	[Dia -2 a -1]	cobertura natural
E08	03/ago	99.0%	0,52	[Dia -4 a -2]	cobertura natural
E09	08/ago	100%	2,90	[Dia +2 a +1]	cobertura natural
E10	14/ago	100%	0,87	[Dia -1 a 0]	I.A
E11	29/ago	100%	0,59	[Dia -3 a -1]	I.A
E13	16/fev	86.0%	1,83	[Dia -2 a -1}	cobertura natural

Tabela 4- Determinação da onda pré-ovulatória de LH (Dia 0) baseada na porcentagem de células superficiais no exame de citologia vaginal, dosagens de progesterona sérica identificadas no primeiro dia de consulta e tipo de manejo reprodutivo (I.A ou cobertura natural) adotado nos animais do grupo experimental (G1). Análise baseados nos critérios descrito por Feldman e Nelson (1996) e Johnston et al., (2001). Botucatu, 2008.

Grupo Controle	Data	% células superficiais	Progesterona (ng/ml)	Varição do provável dia da onda pré-ovulatória de LH com relação a citologia vaginal e dosagem e progesterona	Manejo reprodutivo adotado
C01	16/10	86 %	2,6760	[Dia -2 a +1]	I.A
C02	29/10	50 %	0,30411	[Dia -9 a -4]	I.A
C03	28/10	0%	24,8525	[Dia +7 a +8]	cobertura natural
C04	07/11	7 %	7,3550	[Dia +4 a +7]	cobertura natural
C05	06/11	52%	0,6710	[Dia -6 a -2]	cobertura natural
C06	17/11	93%	7,3550	[Dia +2 a +4]	cobertura natural
C07	22/11	0%	37,9	[Dia +9]	cobertura natural
C09	29/11	41%	7,4231	[Dia -7 a +4]	I.A
C10	05/12	90 %	6,7818	[Dia +1 a +3]	I.A
C11	31/01	12%	2,8468	[Dia -7 a +2]	I.A
C12	08/02	13%	0,4704	(Dia 0 a -3]	I.A
C13	10/09	5%	22.75	[Dia +8]	I.A

Ovariosalpingohisterectomia (OSH)

A OSH convencional foi realizada em todos os animais, entre os dias 6 a 16 após a última cobertura (figura 1), ou seja, 12 a 24 dias após a onda pré-ovulatória de LH. Recomendou-se jejum sólido de 12 horas e jejum hídrico de 3 horas. O procedimento anestésico foi o mesmo utilizado em todos as cadelas e consistia em: 0,05mg/Kg acepromazina e 0,5 g/Kg morfina, por via intramuscular como medicação pré-anestésica e após 10 minutos foi realizada aplicação de 5 mg /kg ketamina e 0,25 mg/Kg de diazepam por via intravenosa e manutenção da anestesia inalatória com halotano. Como terapia pós-operatória, foi recomendado 0,1 mg/Kg de meloxicam durante 2 dias e antibioticotrapia utilizando penicilina benzatina 30.000 UI / Kg por via intramuscular cada 48 horas, por três dias.

A técnica de OSH sem pinças foi utilizada, no intuito de preservar ao máximo as estruturas (figura 2). Utilizou-se fio de nylon pescal 0,60 pra fechamento de parede muscular, fio de nylon pescal 0,30 para fechamento de subcutâneo e nylon monofilamentoso 3-0 para a pele. Foi adotado o tratamento pós-operatório padrão, recomendando o uso de colar Elizabetano, repouso e contenção de movimentos. Realizou-se tratamento da ferida cirúrgica, utilizando-se iodo povidine diluído em solução fisiológica. Os pontos cirúrgicos foram retirados após 7 a 10 dias da cirurgia. As cadelas foram acompanhadas através de retornos em dias alternados.

Determinação do dia da OSH

Para a determinação do dia da realização da OSH foi elaborado um eneagrama, onde foi estimado o provável dia da fertilização (quadro 1). Para cada cadela do grupo controle (GII) que foi castrada em determinado período, uma cadela do grupo experimental foi castrada no mesmo período.

Quadro1: Eneagrama elaborado para determinação do dia da OSH em relação a onda pré-ovulatória de LH (D0) nas cadelas do Grupo Experimental e Controle. Baseado nos critérios de Concannon et al (2000)

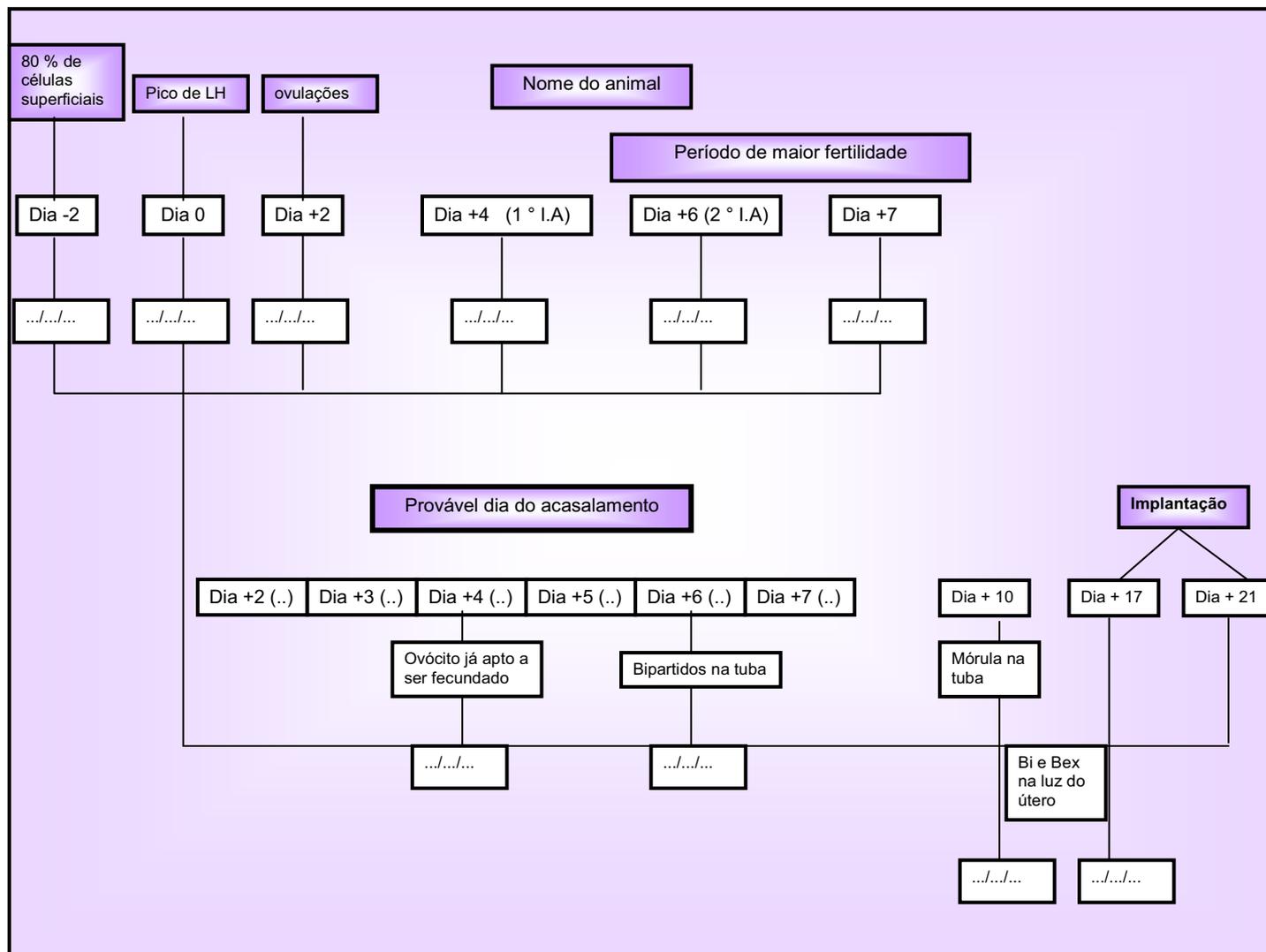


Tabela 5- Determinação da provável idade embrionária baseado no surgimento da onda pré-ovulatória de LH (Dia 0 do ciclo estral) das cadelas dos grupos experimental (subgrupo Ia, Ib e Ic) e controle (subgrupo IIa, IIb e IIc) . Botucatu, 2008.

	animal	Provável idade embrionária	Dias após a onda pré-ovulatória de LH	Dias após a ovulação
Grupo I a	E 05	18	22	20
	E 07	15	19	17
	E0 6	18	22	20
	E11	08	12	10
Grupo I b	E 01	14	18	16
	E 02	16	20	18
	E0 3	17	21	19
	E 04	18	22	20
Grupo I c	E 08	13	17	15
	E 09	13	17	15
	E 10	15	19	17
	E 13	17	21	19
Grupo II a	C 13	20	24	22
	C 01	15	19	17
	C 07	18	22	20
	C 11	09	13	10
Grupo II b	C 03	14	18	16
	C 02	16	20	18
	C 08	20	24	22
	C 04	18	22	20
Grupo II c	C 12	13	17	15
	C 09	13	17	15
	C 05	15	19	17
	C 06	20	24	22

Exames de citologia vaginal:

Os exames citológicos foram realizados com o uso de escova ginecológica. As lâminas foram coradas pelo Panótico² e a identificação dos tipos celulares foram baseadas nos critérios adotados por Johnston et al., (2001), ou seja, levando em consideração a porcentagem de células superficiais sob microscopia de luz (aumento de 200x) para animais em fase folicular (figura 3) e na porcentagem de células parabasais e intermediárias para animais em diestro e ou anestro (figura 4). A coleta para o exame citológico foi realizada em dias alternados desde o primeiro dia da consulta até o dia da OSH, com a finalidade da determinação do provável dia 0 do ciclo

² Panótico (Hematocor® - Biocolor)

estral, de acordo com Feldman e Nelson (1996).

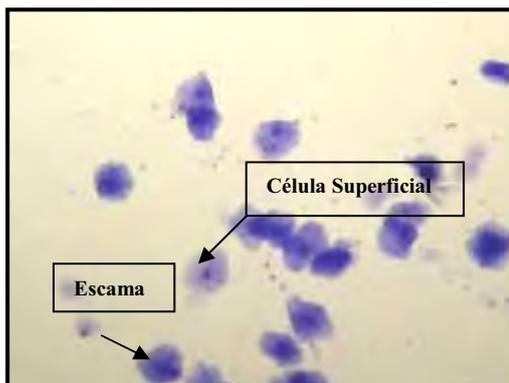


Figura 3- Citologia vaginal do animal C9, indicando presença de 80% de células superficiais que são indicativas da fase folicular do ciclo estral (400x)

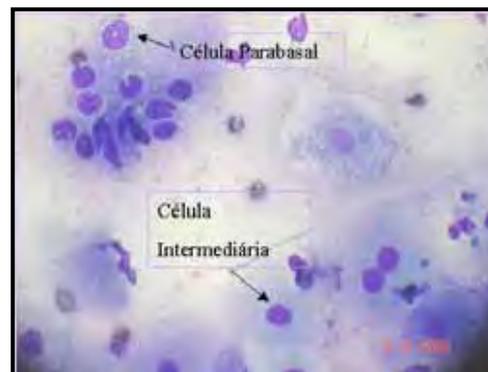


Figura 4- Citologia vaginal do animal C9, indicando mudança abrupta dos tipos celulares para células parabasais e intermediárias indicativa da fase luteal do ciclo estral (400x)

Dosagem de progesterona sérica

As amostras sanguíneas foram coletadas através de punção da veia jugular em frascos sem anticoagulante. Foram retirados em média um volume de 3,0 ml de sangue com seringas de 5,0 mL e agulhas 30x08. O sangue foi centrifugado (Centrífuga LS-3 – Celm) por 10 minutos para obtenção soro. Este soro foi armazenado sob temperatura de congelamento.

A dosagem de progesterona foi realizada pela técnica do radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, sem extração química ou processo de purificação. Para isso foram utilizados Kits comerciais ³.

Hemograma completo:

Foram coletados amostras de sangue (1 a 2 ml), proveniente de punção da veia jugular, em tubos com EDTA, para a realização de hemograma completo, utilizando método automatizado com estudo morfológico em esfregaços corados. Os valores de referência foram os adotados pelo Laboratório Clínico do Hospital Veterinário- Unesp /Botucatu, os mesmos de

³ Kit comercial- Diagnostics Procedure Corporation – progesterone Coat - a - Count, Los Angeles, USA

Meinkoth e Clinkenberard, 2000. Os hemogramas foram coletados no dia da primeira consulta em ambos os grupos e repetidos no dia da OSH e no 45º dia após aplicação do fármaco, apenas no grupo experimental, totalizando 48 amostras.

Coleta de estruturas ovocitárias e embrionárias:

Após a OSH, as tubas uterinas e o útero foram devidamente isolados (figuras 5 e 6) e observados quanto a seus aspectos (figuras 7,8,9,e 10) , os cornos uterinos foram divididos em duas partes e abertos em sentido longitudinal, em placas de Petri (figura 6). As tubas uterinas e o útero foram lavados cuidadosamente para a recuperação de complexo *cúmulos oócitos* (CCO) e/ ou embriões com uma solução de PBS, acrescida de álcool polivinil e heparina, à temperatura de 30°C. Realizaram-se duas lavagens, uma em cada corno uterino, uma em sentido crânio-caudal e outra caudal-cranial. Após esse procedimento, realizou-se a abertura cuidadosa do corpo e cornos uterino, que foram novamente lavados, utilizando uma seringa de 10 ml contendo o meio acima descrito e adaptada a uma sonda uretral felina (Tomcat ®)⁴.

Após delicada dissecação foi realizada a lavagem das tubas uterinas também em ambos os sentidos usando uma seringa de 1 ml e agulha de insulina. Não foi realizada a abertura das tubas uterinas devido à fragilidade dessas estruturas.

Em seguida, os complexos *cúmulus oócitos* (CCOs) e os embriões, foram transferidos para placas de Petri, contendo o mesmo meio descrito anteriormente, sendo observados em Lupa estereomicroscópica para a contagem e avaliação morfológica das estruturas (figura 7). As placas foram previamente identificadas com o nome da porção correspondente. As células da granulosa remanescentes nos CCOs, foram retiradas em meio TL-HEPES-PVA contendo 2 mg/ml de hialuronidase ⁵. Os ovócitos então desnudos, foram lavados três vezes em meio TL-HEPES-PVA e transferidos para as microgotas.

⁴ Tomcat®, Provar, São Paulo

⁵ Hialuronidase- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, H-4272



Figura 1 : Procedimento da OSH



Figura 2 :Tubas uterinas e útero



Figura 5: Identificação das tubas uterinas



Figura 6: Separação e secção dos cornos uterinos



Figura 7: Ovário e tuba uterinas de cadela do grupo experimental



Figura 8: Cornos uterinos de cadela do grupo experimental



Figura 9: Ovário e tuba uterinas de cadelas grupo controle



Figura 10: Cornos uterinos de cadela do grupo controle

Contagem de estruturas ovocitárias e embrionárias:

Os ovócitos foram então avaliados sob Lupa estereomicroscópica (Leica MZ 12,5) (figura 11) quantificados e classificados de acordo com critérios morfológicos de Hewitt e England (1997) em: Grau I- COC com ooplasma homogêneo, escuro e rodeado completamente por uma ou mais camadas de células do cumulus; Grau II- COC com ooplasma levemente pigmentado, com camadas de células do cumulus incompletas e Grau III- ooplasma pálido, freqüentemente disforme e sem células do cumulus (figura 12).

As estruturas embrionárias também foram observadas, quantificadas e avaliados sob Lupa estereomicroscópica quanto a viabilidade e fase de desenvolvimento: Mórula (figura 13), Blastocisto inicial (figura 14), Blastocisto expandido (figura 15) e Blastocisto eclodido (figura 16), seguindo a classificação preconizada por Stringfellow e Seidel (1999).

A taxa de recuperação embrionária foi calculada baseando-se na contagem do número de corpos lúteos após a secção dos ovários dividido pelo número de estruturas coletadas (TSUTSUI et al., 2001).



Fig 11: Lupa estereomicroscópica



Fig 12: Ovócitos classificadas em grau III (aumento 10x)



Fig 13: Mórula (aumento 22,5x)



Fig 14: Blastocistos iniciais (aumento 12,5 x)



Fig 15: Blastocistos expandidos (aumento 22,5 x)



Fig 16: Blastocistos eclodidos (aumento 22,5x)

Viabilidade embrionária:

A viabilidade embrionária foi realizada através da visualização da integridade da cromatina nuclear através da coloração com iodeto de propídeo e Hoechst 33342.

Para a contagem do número de células embrionárias e análise de sua viabilidade, os embriões foram incubados em DPBS acrescido de 1% de BSA e 125 µg/ml de iodeto de propídeo por 15 minutos e transferidos para gotas depositadas sobre lâmina histológica contendo solução de 90% de glicerol em DPBS com 100 µg /ml de Hoechst 33342; em seguida as gotas foram recobertas com lamínula e examinados em microscópio invertido equipado com luz fluorescente (filtro azul 535 e 617 nm).

As estruturas embrionárias que fluoresceram em azul foram consideradas viáveis (Figura 17, 19 e 21), com membrana plasmática íntegra, enquanto aquelas que fluoresceram em vermelho ou rosa foram considerados inviáveis (figura 18 e 20). Embriões com menos de 50 % de células vermelhas foram considerados viáveis.



Figura 17- Ovócito corado com Hoescht e iodeto de propídeo (aumento 400x)



Figura 18- Mórula corada com Hoescht e iodeto de propídeo (aumento 400x)

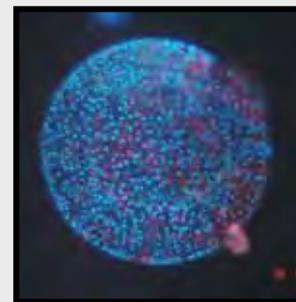


Figura 19- Blastocisto inicial corado com Hoescht e iodeto de propídeo (aumento 400x)



Figura 20- Blastocisto expandido corado com Hoescht e iodeto de propídeo (aumento 400x)

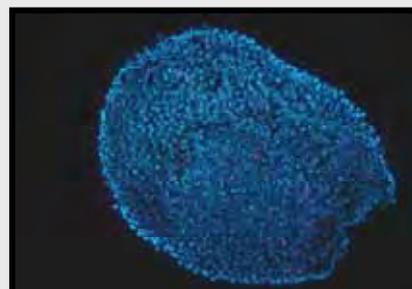


Figura 21- Blastocisto eclodido corado com Hoescht e iodeto de propídeo (aumento 400x)

Comportamento migratório dos embriões

A verificação do comportamento migratório dos embriões da tuba uterina ao útero foi realizada através da observação do local em que os embriões se encontravam após a lavagem em relação a fase embrionária em que o embrião foi recuperado, estabelecendo desta forma, a ocorrência ou não de atraso na migração embrionária. Os embriões considerados com comportamento migratório normal e compatível com o descrito na literatura foram àqueles encontrados na tuba uterina no estágio de mórula até aproximadamente 10 dias após o processo de fertilização. Após 10 dias, os embriões deveriam ser evidenciados no útero.

Clivagem embrionária

O estudo da clivagem embrionária levou em consideração a idade dos embriões coletados em relação a provável fase de desenvolvimento. Estes dados foram analisados de acordo com os valores de referência relatados por Concannon et al. (2000) (tabela 6).

Tabela 6- Valores de referência adotados para análise da clivagem embrionária, baseados em dados relatados por Concannon et al. (2000). Botucatu, 2008.

Dias após a onda pré-ovulatória de LH	Dias após a ovulação	Idade embrionária (dias após a fertilização)	Estágio de desenvolvimento
Dia +2	0	-	Ovulação
Dia +5	3	1	1 célula
Dia +7	5	3	1 a 2 células
Dia +10	8	6	4 células
Dia +11	9	7	4 a 8 células
Dia +12	10	8	8 a 16 células
Dia +13	11	9	Mórulas (tuba uterina)
Dia +14	12	10	Mórula (corno uterino)
Dia +15	13	11	Blastocisto inicial (Bi)
Dia +17	15	13	Blastocisto expandido (Bex)
Dia +18 a Dia +22	16 a 20	14 a 18	Blastocisto eclodido (Bec)
Dia +20 a Dia+23	18 a 21	16 a 19	Implantação

Implantação embrionária

A observação da ausência ou presença de vesículas embrionárias no endométrio foi o método utilizado para a avaliação da implantação embrionária (figura 22). Quando em dúvida, o segmento uterino identificado foi coletado (figura 23) e encaminhado para o Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, onde as amostras foram processadas e exames histológicos foram realizados para a determinação definitiva da estrutura avaliada.



Figura 22: Útero da cadela E 12 (grupo experimental)



Figura 23: Corno uterino da cadela E12

Análise estatística

Para avaliação dos hemogramas foi realizado análise de variância – ANOVA ($p < 0,05$) para medidas repetidas e o teste de Tukey para os parâmetros hematológicos. Para as variáveis: recuperação ovocitária e embrionária foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, na análise de migração e clivagem embrionária foi realizado o teste de qui-quadrado. Para análise de viabilidade embrionária foi utilizado teste exato de Fisher e na para a implantação foi utilizada análise descritiva dos dados. Todos os testes foram realizados a 5% de nível de significância.

RESULTADOS

Os hemogramas foram realizados como critério de seleção para a inclusão dos animais nos grupos experimentais e controle. O hemograma foi realizado em 3 momentos distintos: Momento **M1** (14 dias antes da aplicação da droga), **M2** (14 dias após a aplicação da droga) e **M3** (40 dias após a aplicação da droga). Os valores dos parâmetros analisados encontram-se listados na tabela 7.

Análise hematológica

Tabela 7- Valores da média e desvio padrão referentes à contagem das hemáceas, hemoglobina, volume globular, proteínas totais, contagem de plaquetas e contagem de leucócitos do grupo experimental (G1a)- aplicação 2 a 3 dias após a última cobertura, em três momentos **M1** (14 dias antes da aplicação da droga), **M2** (14 dias após a aplicação da droga) e **M3** (40 dias após a aplicação da droga) e valores de referência considerados. Botucatu, 2008.

Variável	Valores de referencia utilizados	Momento1	Momento 2	Momento 3	p
Hemáceas	5,5 a 8,5 (X 10 ⁶ µL)	6.500.000 ± 302.021 ^a	5.028.000 ± 1.484.552 ^a	6.152.500 ± 430.298 ^a	0,4351
Hemoglobina	12 a 18 (g/dl)	14,7 ± 0,70 ^a	14,675 ± 0,705 ^a	14,675 ± 0,85 ^a	0,9985
Volume globular	37 a 55%	44,25 ± 2,69 ^a	45 ± 3,49 ^a	44,75 ± 2,06 ^a	0,9388
Proteínas totais	6 a 8 (g/dl)	7,2 ± 0,45 ^a	7,5 ± 0,29 ^a	6,95 ± 0,33 ^a	0,2814
Plaquetas	180.000 µL	247.500 ± 33.260 ^a	175.062,5 ± 53.210 ^a	185.162,5 ± 43.006 ^a	0,3973
Leucócitos	6- 17 (x 10 ³ µL)	12.887,5 ± 1.391,7 ^a	11.200 ± 2.440,6 ^a	9.909,75 ± 1.840,2 ^a	0,5142

Letras iguais significam sem diferença estatística

Letras diferentes significam diferença estatística

Tabela 8- Valores da média e desvio padrão referentes à contagem das hemáceas, hemoglobina, volume globular, proteínas totais, contagem de plaquetas, leucócitos do grupo experimental (Glb)- aplicação 4 a 5 dias após a última cobertura, em três momentos **M1** (14 dias antes da aplicação da droga), **M2** (14 dias após a aplicação da droga) e **M3** (40 dias após a aplicação da droga) e valores de referência considerados. Botucatu, 2008.

Variável	Valores de referencia utilizados	Momento 1	Momento 2	Momento 3	p
Hemáceas	5,5 a 8,5 (X 10 ⁶ µL)	6.795.000 ± 449.045 ^a	5.620.000 ± 511.468 ^a	6.200.000 ± 351.852 ^a	0,0780*
Hemoglobina	12 a 18 (g/dl)	16,12 ± 1.09 ^a	13,17 ± 0,65 ^b	14,3 ± 0,70 ^{ab}	0,0366
Volume globular	37 a 55%	47,25 ± 2,78 ^a	38 ± 2,04 ^b	44,25 ± 1,18 ^{ab}	0,0493
Proteínas totais	6 a 8 (g/dl)	7,45 ± 0,36 ^a	7,1 ± 0,21 ^a	7 ± 0,39 ^a	0,3364
Plaquetas	180.000 µL	204.050 ± 30.780 ^a	200.906,25 ± 89.580 ^a	222.031,25 ± 66.845 ^a	0,9084
Leucócitos	6- 17 (x 10 ³ µL)	13.975 ± 1.031,5 ^a	12.400 ± 2.271,2 ^a	10.300 ± 1.347,2 ^a	0,3700

Letras iguais significam sem diferença estatística

Letras diferentes significam diferença estatística

Tabela 9- Valores da média e desvio padrão referentes à contagem das hemáceas, hemoglobina, volume globular, proteínas totais, contagem de plaquetas, leucócitos do grupo experimental (Glc)- aplicação 6 a 7 dias após a última cobertura em três momentos **M1** (14 dias antes da aplicação da droga), **M2** (14 dias após a aplicação da droga) e **M3** (40 dias após a aplicação da droga) e valores de referência considerados. Botucatu, 2008.

Variável	Valores de referencia utilizados	Momento1	Momento 2	Momento 3	p
Hemáceas	5,5 a 8,5 (X 10 ⁶ µL)	6.587.500 ± 139.963 ^a	5.827.500 ± 412.460 ^a	5.822.500 ± 376.837 ^a	0,1137
Hemoglobina	12 a 18 (g/dl)	15,8 ± 1.18 ^a	12,92 ± 0,70 ^a	13,65 ± 0,81 ^a	0,0661*
Volume globular	37 a 55%	43,75 ± 2,46 ^a	38 ± 1,68 ^a	38,75 ± 2,59 ^a	0,0505*
Proteínas totais	6 a 8 (g/dl)	7 ± 0,50 ^a	6,95 ± 0,62 ^a	7,32 ± 0,70 ^a	0,3716
Plaquetas	180.000 µL	366.293,75 ± 138.658 ^a	304.562,5 ± 140.605 ^a	271.781,25 ± 66.298 ^a	0,3981
Leucócitos	6- 17 (x 10 ³ µL)	14.775 ± 1.876,3 ^a	17.375 ± 2.330 ^a	11.500 ± 958,30 ^a	0,1385

Letras iguais significam sem diferença estatística

Letras diferentes significam diferença estatística

Recuperação ovocitária e embrionária

Neste trabalho foram coletadas no grupo experimental (G1): 22 estruturas (tabela 10), sendo 2 mórulas (9,09%), 01 blastocisto eclodidos (4,55%), 8 ovócito grau III (36,36%) e 11 estruturas degeneradas (50%). A taxa de recuperação de estruturas no GI foi de 22,88 %.

No G II (controle) a taxa de recuperação de estruturas foi maior, de 65,85%, sendo: 54 estruturas recuperadas, entre elas, 01 mórula (1,85%), 3 blastocistos iniciais (5,56%), 19 blastocistos expandidos (35,19%), 29 blastocistos eclodidos (53,70%), 01 ovócitos grau III (1,85 %) e 01 estrutura degenerada (1,85%).

Tabela 10: Relação entre o número de corpos lúteos contados e estruturas (oócitos, embriões e estruturas sem condição de identificação) recuperadas em cadelas dos dois grupos estudados: experimental (GI) e controle (GII). Botucatu, 2008.

Grupo experimental	Corpos lúteos	Número de estruturas recuperadas		
		Ovócitos	Embriões	Degenerados
E05	9	0	0	2
E02	4	0	0	0
E 01*	-	0	0	0
E06	14	0	1 mórula	0
E011	13	0	0	7
E07	6	0	0	0
E03	8	8	0	0
E04	5	0	0	0
E10	5	0	1 mórula	0
E08	6	0	0	2
E09	9	0	1 Blastocisto eclodido	0
E13	6	0	0	0
Total	85	8	3	11
Total	85 corpos lúteos	22 estruturas recuperadas		
Grupo controle	Corpos lúteos	Número de estruturas recuperadas		
		Ovócitos	Embriões	Degenerados
C13	9	0	2 blastocistos expandidos)	1
C01*	-	0	3 (blastocistos eclodidos)	0
C07	8	0	6 blastocistos expandidos)	0
C11	9	0	3 blastocistos iniciais 3 blastocistos expandidos	0
C03	9	0	3 blastocistos eclodidos	0
C02	9	1	0	0
C08*	-	0	8 blastocistos expandidos	0
C04	6	0	6 blastocistos eclodidos	0
C12	3	0	1 mórula	0
C09	9	0	7 blastocistos eclodidos	0
C05	9	0	2 blastocistos eclodidos	0
C06	11	0	8 blastocistos eclodidos	0
Total	82	1	52	1
Total	82 corpos lúteos	54 estruturas recuperadas		

* Fêmeas que não foi realizada a contagem de corpos lúteos

A correlação entre número de corpos lúteos contados e número de estruturas recuperadas, foi de $r = 0,48$ no grupo experimental ($p = 0,10$) e de $r = 0,037$ no grupo controle ($p = 0,90$). Estes resultados indicam que não houve correlação entre as variáveis estudadas.

No grupo experimental um total de 5 cadelas, não apresentaram embriões, nem oócitos e nem estruturas degeneradas (E01, E02, E04, E07 e E13). Na cadela E03 foram recuperados apenas oócitos (8), apresentando-se “vazia”. Portanto, o grupo experimental, inicialmente constituído de 12 cadelas provavelmente prenhes, somente 6 foram diagnosticadas gestantes após o procedimento de OSH. O manejo reprodutivo adotado nesse grupo incluiu 06 fêmeas cobertas naturalmente e 06 fêmeas inseminadas artificialmente; das 06 fêmeas não gestantes, 4 foram acasaladas naturalmente e 2 submetidas a I.A.

No grupo controle apenas em uma cadela (C02) foi recuperado oócitos somente (1), nas demais foram recuperados oócitos, embriões e estruturas degeneradas. Neste grupo, de 12 cadelas inicialmente consideradas prenhes, 11 foram efetivamente diagnosticadas com prenhes após o procedimento de OSH e recuperação das estruturas. Sete fêmeas desse grupo foram submetidas a I.A e 5 à cobertura natural. A cadela C02 foi submetida a I.A.

Migração embrionária

Para a análise da migração embrionária levou-se em consideração a fase do embrião recuperado em relação ao local de recuperação

Tabela 11: Análise da migração embrionária realizada em cadelas em diferentes períodos: período A, cadelas tratadas 2 a 3 dias após a última cobertura, período B, cadelas tratadas 4 a 5 dias após a última cobertura, período C, cadelas tratadas 6 a 7 dias após a última cobertura. Botucatu, 2008.

		Migração embrionária		
		Número total de estruturas recuperadas	Número de embriões recuperados	Embriões com migração uterina atrasada
Grupo Experimental	Período A	10	1	0
	Período B	08	0	0
	Período C	04	2	1
Total experimental		22	3	1
Grupo Controle	Período A	18	17	0
	Período B	18	17	0
	Período C	18	18	0
Total controle		54	52	0

Em relação à migração embrionária não foi verificado diferença estatística, entre os grupos experimental e controle ($p= 0,30$).

Clivagem embrionária:

Tabela 12- Análise da clivagem de embriões obtidos em lavados uterinos de cadelas em diferentes períodos: período A, cadelas tratadas 2 a 3 dias após a última cobertura, período B, cadelas tratadas 4 a 5 dias após a última cobertura, período C, cadelas tratadas 6 a 7 dias após a última cobertura. Botucatu, 2008.

		Clivagem do embrião			
		Total de embriões recuperados	*Embriões considerados Atrasados	*Embriões considerados Adequados	*Embriões considerados Adiantados
Grupo Experimental	Período A	01	1 (100%)	0	0
	Período B	0	0	0	0
	Período C	02	1 (50%)	0	1 (50%)
Total experimental		03	02 (75%)	0	01 (25%)
Grupo Controle	Período A	17	11(64,71%)	0	6 (35,29%)
	Período B	17	08 (47,06%)	06 (35,29%)	03 (17,65)
	Período C	18	01 (5,56%)	08 (44,44%)	09 (50%)
Total controle		52	20 (38,46%)	14 (26,92%)	18 (34,62%)

*Valores de referência adotados para análise da clivagem embrionária foram baseados em dados relatados por Concannon et al. (2000).

Na avaliação da clivagem embrionária entre os diferentes períodos analisados (A, B, C) tanto do grupo experimental quanto do grupo controle, não foi observada diferença estatística ($p=0,8$). Na avaliação da clivagem embrionária considerando-se os dois grupos I e II, também não foi constatada diferença significativa para $p=0,6$.

Viabilidade embrionária

Para a análise da viabilidade ovocitária e embrionária não foi analisada todas as estruturas recuperadas, apenas parte das estruturas conforme tabela 13.

Tabela 13- Análise da viabilidade embrionária observada em lavados uterinos de cadelas em diferentes períodos: período A, cadelas tratadas 2 a 3 dias após a última cobertura, período B, cadelas tratadas 4 a 5 dias após a última cobertura, período C, cadelas tratadas 6 a 7 dias após a última cobertura. Botucatu, 2008.

		Viabilidade embrionária			
		Número de embriões coletados	Total de estruturas analisados (amostra)	Viáveis	Não viáveis
Grupo Experimental	Período A	1	1	1	0
	Período B	0	0	-	-
	Período C	2	2	1	1
Total Experimental		3	3	2 (75%)	1 (25%)
Grupo Controle	Período A	17	9	8	1
	Período B	17	5	2	3
	Período C	18	9	6	3
Total Controle		52	23	16 (69,56)	7 (30,43)

Não houve diferença em relação a viabilidade das estruturas, quando se considerou a totalidade dos grupos experimental e controle ($p= 0,5011$). A taxa de degeneração no GI foi de 25% e no GII foi de 30,4%.

Implantação embrionária

Tabela 14- Contagem dos embriões com idade superior a 18 dias de fertilização em diferentes períodos: período A, cadelas tratadas 2 a 3 dias após a última cobertura, período B, cadelas tratadas 4 a 5 dias após a última cobertura, período C, cadelas tratadas 6 a 7 dias após a última cobertura. Botucatu, 2008.

		Implantação embrionária		
		Número total de embriões recuperados	Número de embriões com idade acima de 18 dias da fertilização	Número de implantações identificadas
Grupo Experimental	Período A	01	0	0
	Período B	0	0	0
	Período C	02	0	0
Total experimental		03	0	0
Grupo Controle	Período A	17	6	0
	Período B	17	14	0
	Período C	18	8	0
Total controle		52	28	0

DISCUSSÃO

A problemática envolvendo a superpopulação de cães e gatos, na maioria das cidades, implica em uma discussão ampla que inclui aspectos sociais, econômicos e principalmente éticos. Do ponto de vista sanitário, o médico veterinário atua como um elo entre as diversas condições de controle, principalmente na atividade reprodutiva dessas espécies. O foco do problema da superpopulação muitas vezes é desviado para medidas que não lidam com a causa principal, que é a procriação excessiva e sem controle dos animais.

A parcela da comunidade que mais contribui para o abandono dos animais e conseqüentemente com o aumento dos diversos problemas decorrentes da superpopulação canina e felina, na maioria das vezes não possui condições financeiras de arcar com os custos decorrentes de uma prevenção cirúrgica ou farmacológica eficiente. Em vista dessa situação, pesquisas visando métodos seguros de contracepção, de baixo custo são necessárias e poderiam minimizar os problemas atuais da superpopulação.

Existem hoje no mercado diversas drogas contraceptivas que agem em várias fases do ciclo estral com maior ou menor eficiência. Dentre estas drogas destacam-se os esteróides, as gonadotrofinas e seus análogos, as prostaglandinas, os inibidores de prolactina, os anti-progestágenos (ROMAGNOLI e CONCANNON, 2003; HOFFMAN, 2004; GOBELLO, 2006). A escolha pelo benzoato de estradiol, a despeito das várias pesquisas existentes mostrando os efeitos colaterais sérios desta droga (CONCANNON, 1995, FELMAN e NELSON, 2004), basearam-se em estudos recentes de Tsuitsui et al., 2006, os quais testaram esse fármaco na prevenção da gestação e obtiveram resultados satisfatórios. Este relato estimulou a realização do presente estudo.

Os objetivos principais desse ensaio foi avaliar a taxa de recuperação e degeneração ovocitária/embrionária, a viabilidade, a classificação do estágio de desenvolvimento e comportamento migratório dos embriões das tubas uterinas para o útero, após a administração do benzoato de estradiol. Para tanto, foi necessário a definição da idade gestacional dos embriões coletados, para proporcionar uma análise segura das variáveis estudadas e a determinação do dia da OSH. A determinação da idade embrionária nos cães não é um

procedimento fácil, desde que a própria detecção do momento da ovulação é bastante imprecisa nas cadelas.

A definição da idade embrionária baseou-se inicialmente no provável dia da onda pré-ovulatória de LH (D0), sendo esta a metodologia adotada pela maioria dos autores que trabalham com desenvolvimento embrionário canino (CONCANNON, 2000; ENGLAND e CONCANNOM, 2002; ROMAGNOLI, 2006; TSUTSUI et al., 2006). Para tanto, a porcentagem de células superficiais na citologia vaginal e as dosagens de progesterona sérica foram os dois critérios utilizados neste trabalho (tabelas 3 e 4).

O uso das dosagens hormonais para a detecção da ovulação é bastante discutido. A onda pré-ovulatória de LH e a secreção do FSH estão intimamente relacionadas à ocorrência da ovulação, no entanto a dosagem de LH nas cadelas não é realizada rotineiramente, pois além de dispendiosa, consome tempo, o que explica o fato de muitos pesquisadores optarem pela mensuração indireta da progesterona sérica para estimativa da ovulação (KUSTRITZ, 2001; LOFSTEDT, 2004; REYNAUD et al., 2005; GIER, 2006). Dessa forma, optou-se pela dosagem de progesterona, no intuito de correlacioná-la ao surgimento da onda pré-ovulatória de LH e deste modo estimar o provável dia de ocorrência da fecundação. A concentração plasmática de progesterona de 2 ng/ml (16 nmol/ L), seguindo a literatura, corresponde ao dia 0 do ciclo estral e ao surgimento da onda pré- ovulatória de LH (KUSTRITZ, 2001; LOFSTEDT, 2004; REYNAUD ET AL., 2005; GIER, 2006).

A realização de exames citológicos seriados, desde o início do proestro, pode também auxiliar na determinação da onda pré-ovulatória de LH, segundo Feldman e Nelson (2004); uma contagem de 80% de células superficiais corresponde ao dia da concentração máxima de estrógeno (dia -2 da onda pré-ovulatória de LH). A mudança abrupta dos tipos celulares para parabasais e intermediárias indica o primeiro dia do diestro, o que corresponde ao dia +7 da onda pré-ovulatória de LH. O exame citológico é de fácil realização, porém não determina com acurácia o dia da ovulação.

Para a avaliação das estruturas coletadas: ovócitos, ovócitos degenerados, embriões viáveis ou degenerados, após a lavagem das tubas e cornos uterinos, foi utilizada uma lupa estereomicroscópica e em casos de

difícil identificação as estruturas foram coradas com Hoesch 33342 e iodeto de propídeo. A identificação e avaliação dessas estruturas nem sempre foram fáceis, devido principalmente à aparência escura dos ovócitos e embriões desta espécie, dada pela alta quantidade de grânulos lipídicos presentes no citoplasma dessas células.

De acordo com Tesouriero (1982), os precursores dos grânulos lipídicos são transportados das células foliculares através da ZP, já podendo estar presentes em ovócitos jovens e aumentando em quantidade durante todo o processo da ovogênese. Todos os estudos de morfologia ultra-estrutural e de maturação oocitária nos cães são dificultados pela aparência escura dada pela presença dos grânulos lipídicos.

Em eqüinos, os grânulos lipídicos possuem um papel importante nas fases iniciais de clivagem, mas diminuem quantitativamente na fase correspondente à formação de blastocelo; nesta fase o material citoplasmático rico em grânulos lipídicos é expelido formando debris de massas celulares no espaço perivitelínico. Em cães, entretanto não se observa esta massa no espaço perivitelínico, mas quantidades abundantes de lipídios presentes ainda nos blastocistos expandidos, sendo que a função fisiológica destas estruturas ainda não são conhecidas completamente. Acredita-se que esse material lipídico funcione como uma importante reserva nutricional durante o início do desenvolvimento embrionário, já que o período anterior à implantação é relativamente prolongado na gestação canina (LANDIM e ALVARENGA e BICUDO, 1997).

Inicialmente as lavagem das tubas e cornos uterinos foram difíceis de serem efetuadas, primeiramente, devido à falta de habilidade na realização desse procedimento, o que pode explicar em parte, o menor número de embriões e ovócitos coletados no início do experimento, especialmente no grupo experimental. Apesar do experimento ter sido conduzido de forma aleatória, ou seja, trabalhou-se ora com cadelas do grupo controle, ora com fêmeas do grupo experimental, foi constatado uma diferença significativa entre os dois grupos (Tabela 10). Provavelmente o menor número de estruturas coletadas no grupo experimental deve-se ao efeito da droga.

O aspecto das tubas e cornos uterinos também foram avaliados em todas as fêmeas, após a OSH. Verificou-se que em todos os animais que

receberam o fármaco, o útero e as tubas uterinas apresentavam-se aparentemente espessados (figuras 7 e 8) em relação ao grupo controle (figuras 9 e 10), o que também pode ter contribuído para a dificuldade na lavagem uterina.

A coleta das estruturas dos cornos e tubas uterinas foi realizada de acordo com o preconizado por Tsutsui et al., (2006) com pequenas modificações. O meio utilizado foi o PBS, acrescido de heparina e álcool polivinil, à temperatura de 30°C, o que facilitou a visualização das estruturas coletadas e impediu a aderência entre elas e outros debris celulares. Outros autores, entretanto, utilizaram meios de lavagens contendo Ringer , acrescido de soro fetal canino (TSUTSUI et al., 2001), solução fisiológica (PEREIRA et al., 2007), TCM 199 suplementado com Hepes (HOSSEIN et al., 2006).

Em relação as 5 fêmeas (E01, E02, E04, E7 e E13) nas quais não foram identificados nem embriões e nem oócitos, após o procedimento de lavagem tubárica e uterina, pode-se aventar a possibilidade da ação do próprio estrógeno que aumentaria a contratilidade uterina. De acordo com Clark e Markaverich (1988), o estrógeno é responsável pela síntese de proteína contrátil, auxiliado pela concentração de actomiosina e do sistema adenosina trifosfatase (ATP).

O aumento da contratilidade tubárica, exercida pela droga também poderia ocasionar uma perda maior de ovócitos que não seriam captados pelas tubas uterinas, caindo na cavidade abdominal e explicando uma menor porcentagem de estruturas recuperadas no grupo experimental (CUNHA et al., 2005). Essa contratilidade maior exercida pela droga, poderia estar associada a um provável estímulo dos receptores para oxitocina no endométrio, fato que alteraria o tônus uterino, estimulado tanto pela ação da prostaglandina, como pela ação direta do próprio estrógeno sobre a proteína contrátil.

Outro fator importante relaciona-se ao microambiente tubárico, pois as secreções provenientes deste segmento são de grande importância para a nutrição tanto de embriões, quanto para a maturação ovocitária e fertilização. Sabe-se que o transporte de gametas no oviduto, além de ser auxiliado por contrações das dobras da mucosa do oviduto e mesosalpinge, também é auxiliado pelo fluido tubárico que auxilia na movimentação ciliar (ENGLAND et al., 2006).

Não há estudos com relação a alterações deste microambiente geradas com o uso de estrógeno, mas se os padrões de secreção se alterarem com o uso do fármaco, a baixa recuperação de ovócitos e o alto número de estruturas degeneradas (50%) poderiam ser decorrentes da utilização da droga.

A temperatura do meio de lavagem também é um fator importante a ser ressaltado e que pode ter influenciado os resultados referentes à viabilidade embrionária. Em suínos, temperaturas abaixo de 10°C são consideradas nocivas à sobrevivência embrionária, e Nieman (1985) atribuiu esse efeito à alta quantidade de lipídios presente nos blastômeros dessa espécie.

A taxa de recuperação de estruturas foi calculada baseando-se na contagem do número de corpos lúteos após a secção dos ovários dividido pelo número de estruturas coletadas. O resultado em ambos os grupos mostrou que não houve uma relação entre o número de corpos lúteos contados e o número de estruturas recuperadas, independente da aplicação da droga. Tanto Renton (1991) como Cunha et al., (2005) observaram que o número de corpos lúteos raramente coincide com o número de ovócitos e embriões recuperados e atribuem esse achado, ao fato de que após a ovulação, alguns ovócitos podem não ser captados pelas tubas uterinas.

Independente desse achado, as taxas de recuperação tanto de ovócitos como de embriões foram maiores no grupo controle. No grupo experimental das 12 cadelas consideradas inicialmente, 06 não estavam prenhes, portanto, apenas 06 animais foram considerados efetivamente gestantes, diminuindo o número de estruturas recuperadas. No grupo controle 11 fêmeas estavam prenhes aumentando a possibilidade de recuperação de estruturas e a taxa de recuperação.

Considerando o manejo reprodutivo adotado na pesquisa (cobertura natural X I.A) os dois grupos considerados incluíam cadelas inseminadas e acasaladas naturalmente quase na mesma proporção. No grupo experimental das 12 cadelas, 06 cadelas foram inseminadas e 06 foram acasaladas; das 6 cadelas inseminadas, 04 estavam prenhez. No grupo controle, das 12 fêmeas, 05 foram inseminadas e 7 acasaladas; das 5 fêmeas inseminadas, 4 estavam gestantes.

Em relação ao manejo reprodutivo adotado foi observado que em um total de 11 cadelas inseminadas, 08 tornaram gestantes. Nas cadelas

acasaladas naturalmente (13), 06 tornaram-se gestantes. Nas cadelas em que foi utilizada a I.A, a taxa de gestação foi um pouco maior quando comparada as cadelas acasaladas naturalmente, porém, o manejo reprodutivo adotado não pode ser considerado o único fator responsável pela maior taxa de recuperação no grupo controle.

Nos estudos de PEREIRA et al., (2007) a taxa de recuperação embrionária foi de 71% quando utilizaram laparotomia e lavagem uterina e 91% no grupo no qual usaram a OSH. Neste estudo as cirurgias foram realizadas no 12º dia após a primeira cópula e foram recuperados 33 estruturas embrionárias, sendo 20 blastocistos (66,6%) em diferentes estádios de desenvolvimento, 4 mórulas (12,12%), 7 estruturas degeneradas (21,21%) e 2 zonas pelúcidas rompidas (6,06%). Já TSUTSUI et al., 2001 obtiveram uma recuperação embrionária em torno de 97,1% com a OSH realizada 4 a 6 dias após último acasalamento com a taxa de degeneração deste autor foi de 26,3 %.

A taxa de recuperação de estruturas verificada neste trabalho foi menor (GI = 22,88 % X GII = 65,85%) quando comparada com os resultados de Pereira et al., (2007) e Tsutsui et al., (2001) tanto no GI como no GII. Essas diferenças podem ser explicadas pelos dias nos quais foram realizadas as lavagens e coletas. Pereira et al., (2007) efetuaram as lavagens no 12º dia após a primeira cobertura, portanto, mais precocemente, inclusive em um período anterior a invasão endometrial que se inicia por volta do 13º dia de gestação. Neste período as reações inflamatórias locais, caracterizadas pelo aparecimento de edema, infiltração neutrofílica e linfocitária, (VERSTEGEN-OCLIN e VERSTEGEN, 2008) ainda não ocorreram o que pode ter facilitado o seu procedimento de coleta; isto também explica as taxas mais altas de recuperação. A mesma situação pode ser atribuída nos trabalhos de Tsutsui et al., (2006).

Tsutsui et al., (2006) utilizaram fêmeas beagles, com idade variando entre 1 a 10 anos, pertencentes a um canil próprio, fato que provavelmente auxiliou em seu manejo reprodutivo. Esses autores realizaram a estimativa da ovulação através de dosagens seriadas de progesterona, acasalando suas fêmeas uma única vez, 3 dias após a ovulação. As concentrações plasmáticas de LH também foram realizadas. A coleta dos embriões foi realizada 8 a 16 dias após a ovulação.

Cunha et al., (2005) obtiveram uma recuperação embrionária média de 68,50%; nesse trabalho os autores coletaram apenas embriões de 8 células nas tubas uterinas e embriões de 2 células até blastocisto eclodido nos cornos uterinos; Renton et al. (1991) observaram uma recuperação embrionária de 77%.

As diferenças dos valores encontrados neste estudo (22,88 % para o GI e 65,85% para o GII) quando comparada aos de Swanson et al., (1994) 87,5 % e Tsutsui et al., (2001) 97,10% pode ser entendida não só pela falha na captação dos ovócitos, mas também por dificuldades no método utilizado para recuperação das estruturas, principalmente no grupo experimental.

Neste experimento não foi observado uma associação entre o tratamento utilizado e o atraso na clivagem, quando se considerou a totalidade das estruturas, conforme os resultados evidenciados por Tsutsui et al., (2006). No entanto, o grupo I (experimental), apresentou um baixo número de embriões recuperados (3 embriões), o que pode indicar uma ação embriotóxica do fármaco na tuba uterina.

Nos subgrupos experimentais foram constatados tanto atrasos nas divisões embrionárias, como também embriões com a clivagem mais adiantada do que o esperado, fato que pode indicar a ocorrência de falha na determinação da provável idade embrionária. Deve-se levar em conta ainda, o tempo relativamente longo de permanência dos ovócitos nas tubas uterinas, associado a longevidade dos espermatozoides no trato reprodutivo das fêmeas (REYNAUD et al., 2006).

Em situações normais, durante o período de pré-implantação nas cadela, podem ser encontrados embriões em diferentes estádios de desenvolvimento o que não resulta em alteração no desenvolvimento normal da gestação ou desenvolvimento anormal desse embrião. Em nosso estudo, entretanto, a cadela C11 foi a única a apresentar embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (3 blastocistos iniciais e 3 blastocistos expandidos)

Não foi identificada nenhuma estrutura nas tubas uterinas em cadelas que foram submetidas a OSH, antes do 10º dia da provável fecundação; esses resultados contrariam o descrito na literatura, que consideram o achado de

estruturas nas tubas uterinas até o 12º dia pós-fertilização (CONCANNON 2000, ENGLAND e CONCANNON, 2000; ROMAGNOLI, 2006). Já Lofstedt, (2004) considera o achado de mórula em tuba uterina até o 11º dia da onda pré ovulatória de LH, ou 6º dia, pós-fertilização.

Em castrações realizadas após o 10º dia da provável fecundação, foram observadas duas mórulas presentes ainda em tubas uterinas, uma em cada grupo considerado (cadelas C12 e E6). Essa situação quando considerado apenas o GI poderia estar associada ao uso do benzoato de estradiol, mas como também foi evidenciado no GII, essa condição pode estar apenas relacionada à maneira como foi estipulada a idade embrionária.

Quanto à viabilidade das estruturas coletadas, não foi notada diferença estatística entre os grupos controle e experimental, logo o processo de degeneração das estruturas não pode ser correlacionado diretamente ao uso da droga, pois o índice de embriões degeneradas coletadas do grupo controle foi superior (30,4%) ao encontrado no grupo experimental (25%). Esse resultado contradiz o conceito preconizado por Raskin (1998); Brunckhorst et al. (2000); Feldman e Nelson (2004) os quais afirmaram que os estrógenos podem exercer um efeito tóxico direto sobre os embriões, interrompendo desta forma a prenhez. Uma das situações a ser considerada nesse aspecto, é o princípio ativo do estrógeno utilizado, talvez o ECP e o valerato de estradiol apresentem uma ação embriotóxica mais acentuada do que o benzoato de estradiol. Em números absolutos, entretanto, 11 estruturas encontravam-se degeneradas no GI, enquanto no GII, controle, apenas uma estrutura apresentava-se degenerada; provavelmente se o número de estruturas avaliadas fossem maiores talvez os resultados demonstrassem uma diferença importante entre os grupos.

A coloração utilizada neste trabalho para testar a viabilidade embrionária foi o corante Hoescht 33342 que identifica o DNA “vital” e é realizada através da ligação do corante à bases pares A-T do material genético no núcleo da célula. Esse processo não requer permeabilização celular, pois o corante é permeável à membrana plasmática intacta e o transporte ocorre de forma ativa (CASEY et al., 1993). Este método de coloração é eficaz em vários tipos celulares, (WESTON, 1990); já o iodeto de propídio é um corante fluorescente que também se liga ao DNA, intercalando-se especificamente entre as bases,

mas normalmente não atravessa a membrana celular, sendo pouco lipossolúvel.

Outro corante normalmente utilizado para avaliar a viabilidade embrionária é a acridina orange e o iodeto de propídeo. Estes corantes normalmente são utilizados em embriões em estágios iniciais de desenvolvimento; neste caso, há a possibilidade tanto da contagem do número de células, quanto da avaliação da viabilidade celular e integridade nuclear. Em embriões em estágios mais avançados, os blastômeros aumentam em quantidade e diminuem em tamanho, tornando difícil a avaliação da morfologia nuclear em microscopia óptica, cujo aumento atinge 1000 x. (ZAKERI et al., 2002)

Um outro fato interessante a ser considerado, na análise da viabilidade, é que mesmo que a estrutura avaliada apresente clivagem alterada, não necessariamente a viabilidade também está comprometida e o contrário também é válido; o embrião pode estar com a clivagem compatível ao dia de coleta, porém, após a coloração mostrar um aspecto inviável, o que torna difícil a correlação entre essas duas variáveis.

As implantações não foram observadas em ambos os grupos estudados. A coleta dos embriões foi realizada entre os dias 6 a 16 após a última cobertura, ou seja, do 12° a 24° dia pós-onda pré-ovulatória de LH, sendo os embriões com idade variando entre 8 a 20 dias de fertilização. A fase de ocorrência da implantação nas cadelas segundo Allen (1995), Concannon (2000), Reynaud et al., (2006), Gunzel-Apel (2008), Pretzer (2008) e Verstegen-Oclin e Verstegen (2008) ocorre 18 a 21 dias após as ovulações, ou seja, 20 a 23 dias da onda pré-ovulatória de LH.

Considerando essas estimativas, esperava-se encontrar embriões implantados pelo menos no grupo controle, desde que nesse grupo foram recuperados 28 embriões com idade superior a 18 dias de fertilização (tabela 4). Uma das possíveis explicações para o ocorrido é a dificuldade no estabelecimento da idade embrionária, utilizando a citologia vaginal e a progesterona sérica como métodos indiretos de predizer o momento da onda pré-ovulatória de LH. Outra possibilidade é a dificuldade de se visualizar o sítio de implantação macroscopicamente; o processo de implantação nos animais é

lento e gradativo e talvez as modificações iniciais deste processo não possam ser visibilizadas após a lavagem e abertura do útero, sendo necessário procedimentos de microscopia de luz.

No grupo experimental, a cadela E12 apresentou uma estrutura que gerou dúvidas em relação a implantação, porém, após estudo histológico a implantação foi descartada. A ausência de implantação poderia ser imputada à ação do benzoato de estradiol, uma vez que um dos efeitos esperados da droga é a prevenção da implantação, porém, devido a um baixo número de embriões recuperados no grupo experimental, essa avaliação ficou comprometida, além disso, todos os 3 embriões recuperados desse grupo possuíam idade inferior a 18 dias de fertilização, estando portanto, em uma fase de pré-implantação,

A definição do momento exato da implantação é difícil, em parte pela dificuldade que existe na diferenciação macroscópica dos sítios de implantação. Segundo Barrau et al., (1975) esta diferenciação já se inicia após o décimo dia do final do estro, através da observação de alterações por toda extensão do corno uterino e edema das glândulas das zonas basais e intermediárias do endométrio, porém a invasão endometrial ocorre somente por volta do 13º dia de gestação. No 16º dia de gestação é verificada uma expansão considerável dos sítios de implantação e a invasão primária estende-se completamente por todo o útero, menos ventralmente ao embrião, porém a penetração máxima do trofoblasto só é observada em torno do 26º dia, caracterizando a maturação do sincício fetal .

Levando-se em consideração a descrição de Barrau et al., (1975) onde a penetração máxima do trofoblasto só é vista em torno do 26º dia da fertilização, acredita-se que as castrações nesse trabalho, foram realizadas muito cedo em relação ao período da provável implantação.

A despeito das ações do benzoado de estradiol descritas na literatura ressaltando essa droga como embriotóxica, responsável pela alteração no movimento migratório dos embriões nas tubas uterinas e como preventiva no processo de implantações o que a indicaria como droga contraceptiva na espécie canina, neste trabalho foi observado uma taxa de recuperação de estruturas inferior ao grupo controle, sendo que 50 % das estruturas

recuperadas encontravam-se degeneradas, reforçando a ação embriotóxica da droga.

Os estrógenos deixaram de ser utilizados na clínica reprodutiva principalmente devido aos seus efeitos colaterais graves associados principalmente ao aparecimento de petéquias, sufusões e hemorragias graves que ocorriam alguns dias após a aplicação da droga (WEISS e KLAUSNER, 1990).

Estudos conduzidos por Weiss e Klausner (1990) verificaram que a ação do estrógeno sobre a medula óssea ocasiona alterações sanguíneas como trombocitopenia, anemia progressiva, leucocitose, porém essa supressão mostra-se transitória, pois cerca de 30 a 40 dias da aplicação do fármaco, os parâmetros hematológicos retornam ao normal, atentando para o fato de que provavelmente existe um efeito transitório e uma variação individual aos efeitos do estrógeno.

O mecanismo de ação do estrógeno sobre a medula óssea não é completamente conhecido, sabe-se entretanto, que após a administração do estrógeno, cerca de 1 a 3 semanas após a aplicação da droga, há formações de colônias de macrófagos granulocíticas e fibroblásticas na medula óssea. Estudos *in vitro*, entretanto não revelaram supressão da medula óssea (WEISS e KLAUSNER, 1990).

A principal alteração hematológica relacionada ao uso de estrógeno é a anemia aplásica da medula óssea, onde se observa falência de todas as linhagens de células sanguíneas, associada à citopenias e substituição da medula hipocelular por tecido adiposo. Esta falência da medula óssea é uma das maiores causas da depleção na circulação das células sanguíneas, sendo também denominada de aplasia das células vermelhas puras, agranulocitose ou trombocitopenia amegacariocítica (WEISS e KLAUSNER, 1990).

Também são atribuídos aos estrógenos outros efeitos colaterais, tais como a neoplasia mamária e piometra, entretanto, o período de ação longo do dietilbestrol, estradiol, estrona e outros compostos sintéticos de estrógeno (variando de 7 a 10 dias), são considerados perigosos, pois ocupam por um grande período de tempo os receptores de estrógenos em tecidos alvos. Já compostos como estriol, ocupam os receptores por um curto período de tempo

e possuem absorção mínima, apresentam efeitos colaterais mais leves O benzoato de estradiol é considerado uma droga de curta duração possuindo um período de meia vida de 3 dias (ROMAGNOLI, 2006).

De acordo com Bowen et al., (1985) a diferença entre doses utilizadas e número de aplicações do fármaco podem influenciar os resultados de prevenção de gestação como também o aparecimento dos efeitos colaterais sobre o sistema hematológico. Tsutsui et al., (2006), correlacionaram o aparecimento de efeitos colaterais em cadelas que receberam benzoato de estradiol. Em seus estudos, a dose de 0,2 mg/kg, foi considerada a dose de máxima eficiência, ou seja, a dose em que houve prevenção de 100% de gestação e ausência de efeitos colaterais.

A possibilidade de usar compostos estrogênicos para prevenir a implantação de embriões resultantes de coberturas indesejáveis estimulou a realização desse projeto, uma vez que tanto a droga escolhida, como o protocolo utilizado, permitia o uso desse fármaco com uma certa segurança (TSUTSUI et al., 2006). A inclusão da avaliação hematológica dos grupos, em 3 momentos, visou a possibilidade de identificar possíveis efeitos prejudiciais da droga sobre a medula óssea dos animais.

O grupo Gla (cadelas que receberam a aplicação de benzoato de estradiol entre o 2° e 3° dias após a última cobertura) não apresentou diferenças estatísticas entre os 3 momentos avaliados; o grupo Glb (cadelas que receberam a aplicação de benzoato de estradiol entre o 4° e 5° dias após a última cobertura), ao contrário, apresentou valores estatisticamente diferentes relacionados a hemoglobina e ao volume globular (VG) , os valores referentes a hérmáceas apresentaram apenas uma tendência estatística. O grupo Glc (cadelas que receberam a aplicação de benzoato de estradiol entre o 6° e 7° dias após a última cobertura) apresentou apenas uma tendência estatística referente as variáveis hemoglobina e VG.

No município de Botucatu a erliquiose canina é considerada endêmica, sendo uma das principais enfermidades infecciosas atendida na clínica médica de pequenos animais, A presença de sintomas clínicos e alterações laboratoriais inespecíficas como a trombocitopenia podem aumentar a suspeita da doença em caninos em áreas endêmicas. Na análise individual dos

parâmetros hematológicos foi observado a ocorrência de uma diminuição dos valores plaquetários, 15 dias após a aplicação da droga (momento 2). Esse fato foi devidamente considerado como ação do benzoato de estradiol, sem entretanto, excluir a possibilidade da ocorrência de erliquiose associada em algumas cadelas, com o procedimento cirúrgico (OSH)

As alterações do VG e hemoglobina, observadas neste experimento, podem ser atribuídas a perdas sanguíneas decorrentes do processo cirúrgico, já que no momento 2, 15 dias após aplicação da droga, algumas fêmeas já tinham sido submetidas a OSH, no entanto, o retorno aos parâmetros hematológicos normais ocorreu em todas as cadelas do grupo experimental, conforme observado nas tabelas 7, 8 e 9. Independentemente do dia da aplicação da droga, todos os animais apresentavam hemograma normal no final do experimento, sem nenhuma alteração fisiológica ou hematológica. Estes resultados são concordante com os estudos de Weiss e Klausner (1990), que verificaram que a ação do estrógeno sobre a medula óssea ocasiona alterações sanguíneas iniciais, porém esse efeito é transitório. Outra situação a ser levada em conta é a meia vida da droga utilizada (3 dias) que não seria suficiente para causar alterações hematológicas.

Estudos realizados por Weiss e Klausner, (1990) avaliaram o uso do cipionato de estradiol e o dietilbestrol na prevenção da gestação. Os animais avaliados apresentaram equimose hemorrágica cutânea, mucosas pálidas, secreção vulvar e diagnóstico final de aplasia de medular, caracterizada pela ausência de megacariócitos, hipoplasia eritróide e hiperplasia granulocítica. Atribuí-se ao cipionato de estradiol uma maior toxicidade entre as categorias de estrógeno, provavelmente devido ao seu período de meia vida maior (BOWEN et al, 1985). Doses acima de 1 mg de cipionato de estradiol, geram anemia aplásica severa ou até mesmo morte do animal, entretanto, o dietilbestrol, apesar de não induzir a efeitos tóxicos, não preveniu de forma eficaz a gestação.

A observação de doenças reprodutivas nas fêmeas que receberam benzoato de estradiol não foi realizada, já que essas cadelas foram castradas, o que impossibilitou a avaliação destes parâmetros. A ocorrência de outros sinais clínicos atribuídos ao uso de estrógeno, tais como: retorno ao estro,

edema vulvar e sangramento vaginal foram observados em apenas uma cadela do grupo experimental, pertencente ao grupo Glc.

O comportamento de estro foi prolongado em todas as cadelas do grupo experimental, inclusive, houve relato de nova cobertura em uma das fêmeas, dias após a OSH (cadela E09, pertencente ao Glc). O edema vulvar foi observado em todas as cadelas, já o exame de citologia vaginal foi realizado, mas desconsiderado desde que o material proveniente do esfregaço revelou-se bastante espesso impossibilitando a diferenciação entre os tipos celulares.

O período de aplicação da droga que não induziu nenhuma alteração hematológica foi o período “a” (entre o 2 e 3 dias), esse momento foi o mais seguro em relação aos demais com relação à aplicação da droga, sem causar efeitos colaterais importantes.

São poucos os estudos efetuados utilizando o benzoato de estradiol como droga contraceptiva. Sua baixa popularidade que por muito tempo desestimulou pesquisas por parte da comunidade científica é gerada principalmente pela ampla divulgação de seus efeitos colaterais, as vezes fatais, em detrimento de seu efeito contraceptivo e seu baixo custo. Em nosso ensaio, apesar de não repetirmos os mesmos resultados obtidos por Tsutsui et al., (2006) os efeitos colaterais apresentados pelas cadelas foram leves com recuperação dos parâmetros hematológicos. Maiores estudos a respeito da ação do estrógeno, principalmente com relação ao microambiente tubárico, devem ser realizados para desvendar novos mecanismos de ação que poderiam explicar a diferença existente entre o número de estruturas recuperadas, especificamente embriões, que ocorreu após a administração da droga. A aplicação dessa droga numa determinada população de cães talvez possa apresentar resultados efetivos do ponto de vista epidemiológico.

A utilização do benzoato de estradiol com uma medida de contracepção de emergência pode ser efetuada, devido ao seu baixo custo, porém não descarta-se uma avaliação de diagnóstico de gestação (próxima aos 30 dias pós cobertura), pois caso não tenha sido eficaz, outro fármaco poderia atuar na interrupção desta gestação. Discussões cuidadosas sobre o assunto devem ser consideradas, as reações individuais de cada fêmea devem ser ponderadas, antes da utilização de determinados hormônios com fins contraceptivos.

CONCLUSÃO

O uso de 0,2 mg/Kg de benzoato de estradiol, em uma única aplicação, IM, entre o 2° e 7° dias após a última cobertura nas cadelas:

- Influencia a taxa de recuperação e degeneração ovocitária e ou embrionária.
- Não afeta a viabilidade e o comportamento migratório dos embriões das tubas uterinas para o útero.
- Não altera a clivagem dos embriões, independente dos períodos de aplicação do benzoato de estradiol.
- O período de observação da implantação utilizado neste experimento foi inadequado, provavelmente muito precoce.
- As alterações hematológicas foram notadas apenas nas cadelas que receberam o benzoato de estradiol entre 4 e 5 dias após a última cobertura.
- Não foi possível correlacionar o uso da droga com períodos de aplicação, considerando a data da última cobertura como parâmetro.

REFERÊNCIAS*

ALLEN, W.E. Prenhez. In: Alen, W.E. **Fertilidade e obstetrícia no cão**. São Paulo: Liv. Varela, 1995, cap.10, p. 57-58.

BARRAU, M.D.; ABEL, J.H.; TORBIT, C.A.; TIETZ, W.G. Development of the implantation chamber in pregnancy bitch. **Am. J. Anat.**, v.143, p.115-130, 1975.

BOWEN, R.A.; OLSON, P.N.; BEHRENDT, M.D.; WHEELER, S.L.; HUSTED, P.W, NETT, T.M. Efficacy and toxicity of estrogen commonly used to terminate canine pregnancy. **J. Am. Vet. Assoc.**, v.186, n.8, p.783-787, 1985.

BYSTED, B.V.; DIELEMAN, S.J.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.57, p.181-186, 2001.

BRUNCKHORST, C.S.; VUONO, L.; BARNABE, R.C. Interrupção eletiva da gestação em cães (*canis familiares*, Linnaeus, 1758). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.37, n.03, p. 1-3, 2000.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBINS, E.Z. Validation of an acrossomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **J. Androl.**, v.14, n.4, p.289-297, 1993.

CONCANNON, P.W.; MCCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and Endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.39, p.3-25, 1989.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação- Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

CONCANNON, P.W. Contraception in dogs and cats. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 29., 2004, Rhodes. **Proceedings ...** 2004a.

CONCANNON, P.; TSUTSUI, T.; SHILLE, V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 57, p.169-179, 2001.

CONCANNON, P.W. Canine Breeding management and artificial insemination: Techniques and Caveats. In: WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 29., 2004, Rhodes. **Proceedings.** 2004b.

CONCANNON, P.W.; VERSTEGEN, J. Some unique aspects of canine and feline female reproduction important in veterinary practice. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 30., 2005, Mexico City. **Proceedings ...**Mexico City, 2005, p.1-8.

CONCANNON, P.W. Canine pregnancy: Predicting parturition and timing events of gestation. In: CONCANNON, P.W ET AL. **Recent advances in small animal reproduction**, Ithaca: International Veterinary Information Service, 2000. Disponível em: <<http://www.ivis.org/>>. Acesso em: 18 set. 2007.

CONCANNON, P.W.; CASTRACANE, V.D.; TEMPLE, M.; MONTANEZ, A. Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. In: II INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, 6., 2009, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 2009, p. 172- 190.

CHUERY, A.C.S.; BAGNOLI, V.R.; FONSECA, A.M.; PARELLADA, C.I. Hormonioterapia na menopausa. In: FIGUEIREDO, S.R. **Portal da Ginecologia**. Disponível em: /<http://www.portaldeginecologia.com.br/> acesso em 10 jun 2008.

CUNHA, G.N.; JACOMINI, J.O.; BELETTI, M.E. Taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial em fêmeas caninas (*Canis Familiaris*-Linnaeus, 1758). **Biotemas**, v. 18, n. 2, p- 155-167, 2005.

DE LOS REYES, M.; LANGE, J.; MIRANDA, P.; PALOMINOS, J.; BARROS,C. Ultrastructural study of canine zona pellucida surface during in vitro maturation. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 6., 2008, BIENNIAL EVSSAR CONGRESSS, Vienna. Proceedings...Viena, 2008., p.XXX.**

ENGLAND, G.; CONCANNON, P.W. Determination of the optimal breeding time in the bitch; Basic consideration. In: CONCANNON, P. W., ENGLAND, G.C.M., VERSTEGEN,J. **Recent advances in small animal reproduction**. Ithaca: International Veterinary Information Service. Disponível em: </http://www.ivis.org/>. Acesso em 13 de dez 2006.

ENGLAND, G.C.; BURGESS, C.M.; FREEMAN, S.L.; SMITH, S.C.; PACEY, A.A. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. **Theriogenology**, v. 6, n. 6-7, p.1410-1418, 2006.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2.ed, Philadelphia: W.B Saunders Company, 2004. 78p.

FIENI, F.; BRUYAS, J.F.; BATTUT, I.; TAINTURIER, D. **Clinical use of anti-progestin in the bitch**. In: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.C.W.; VERSTEGEN.; J. Recent advances in small animal reproduction. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: <http://www.ivis.org/>. Acesso em: 15 mar 2006.

GIER, J.; KOOISTRA, H.S.; DAJAJADININGRAT-LAANEN, S.C.; DIELEMAN, S.J.; OKKENS, A.C. Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone around the time of ovulation in the bitch. **Theriogenology**, v.66, n.6-7, p.1419-1422, 2006.GOBELLO, C..

Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: a review. **Theriogenology**, v.66, n.6-7, p.1560-1567, 2006.

GOODROWE, K. L.; HOWARD, J. G.; WILDT, D. E. Comparison of embryo recovery, embryo quality, oestradiol-17 α and progesterone profiles in domestic cats (*Felis catus*) at natural or induced oestrus. **J. Reprod. Fertil.**, v.82, p.553-561, 1988.

GUNZEL–APEL, A.R. Influence of progesterone withdrawal on pregnancy related parameters during post-implantation early pregnancy loss. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 6. 2008, BIENNIAL EVSSAR CONGRESSS, 6., 2008, Vienna. **Proceedings**...Vienna, 2008, p.104- 109.

HOFFMAN, B. Hormonal control of pregnancy and parturition in the dog. In: WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 29., 2004, Rhodes. **Proceedings**...Rhodes, 2004.

HOSSEIN, M.S.; KIM, M.K.; JANG, G.; FIBRIATO, H.Y.; OH, H.J.; KIM, H.J.; KANG, S.K.; LEE, B.C. Influence of season and parity of the recovery of in vivo canine oocytes by flushing fallopian tubes. **Anim. Reprod. Sci.**, v.99, n.3-4, p.330-341, 2007.

JEFFCOATE, J. Physiology and endocrinology of the bitch. In: SIMPSON, G; ENGLAND, G; HARVEY, M. **Manual of small animal reproduction and neonatology**. Shurdington: British Small Animal Association, 1998. p. 1-9.

KNOBIL,E.; NEILL. The Physiology of reproduction. In: CLARK,J.; MARKAVERICH,B. **Action of ovarian steroids hormones**. 1.ed, New York: Ed. Raven Press, 1988, 692-693p.

KUSTRITZ, M.V. Use of commercial luteinizing hormone and progesterone assay kits in canine breeding management. In: CONCANNOM, P.W.,

ENGLAND, G; VERSTEGEN, J. **Recent advances in small animal reproduction**, Ithaca: International Veterinary Information Service, NY, 2001a. Disponível em: [http: <www.ivis.org/>](http://www.ivis.org/). Acesso em: 15 maio 2008.

KUSTRITZ, M.V. Use of supplemental progesterone in management of canine pregnancy. In: CONCANNOM, P.W., ENGLAND, G; VERSTEGEN, J. **Recent advances in small animal reproduction**, Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001b. Disponível em: [<http: www.ivis.org/>](http://www.ivis.org/). Acesso em: 25 out. 2008.

LOFSTEDT, R. Applied reproductive physiology of bitches. Section A: The bitch. In: _____. **A manual for theriogenology**, 2004, p. 3-8.

LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S.; BECCAGLIA, M. Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. **Reprod. Domest. Anim.**, v.41, p. 286-290, 2006.

MEINKOTH, J.M.; CLINKENBERARD, K. Normal hematology of the dog. In: FELDMAN, B; ZINKL, J; JAIN, N. **Schalm's Veterinary Hematology**, Austrália, 5.ed, Blackwell Publishing, 2000, 7 p.

MOORE, H.D. Molecular biology of fertilization. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n.57, p.105-110, 2001.

NIEMAN, H. Sensivity of pig morulae to DMSO/ PVP or glycerol treatment and coling to 10 °C. **Theriogenology**, v.23, n.1, p. 213, 1985.

OLSON, P.N.; NETT, T.M.; BOWEN, R.A.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. Endocrine regulation of the corpus luteum of the bitch as potential target for altering fertility. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n.39, p.27-40, 1989.

PEREIRA, J.J.; HOLANDA, C.C.; ARÊAS, V.S.; LIMA, K.R.O.; SALGADO, A.E.P.; GIANNOTTI, J.G.; LUZ, M.R. Comparação de duas técnicas para colheita de embriões caninos. **Acta Sci. Vet**, v. 35, supl. 3, p. XXX-XXX, 2007.

PRETZER, S.D. Canine embryonic and fetal development: A review. **Theriogenology**, v.70, p.300-303, 2008.

RASKIN, R.E. Hemáceas, leucócitos e plaquetas. In: Birchard, S.J & Sherding, R.G. **Manual Saunders. clínica de pequenos animais**. São Paulo: Rocca, 1998. 1591p.

RENTON, J. P.; BOYD, J. S.; ECKERSALL, P. D.; FERGUSON, J. M.; HARVEY, M. J. A.; MULLANEY, J.; PERRY, B. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). **J. Reprod. Fertil**, v.93, p. 221-231, 1991.

REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; VIARIS DE LESEGNO, C.; CHASTANT-MAILLARD, S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**, v.130, p.193-201, 2005.

REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; VIARIS DE LESEGNO, C.; CHASTANT-MAILLARD, S. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review. **Theriogenology**, v.66, n.6-7, p.1685-1693, 2006.

ROMAGNOLI, S, E.; CELA, M.; CAMILLO, F. Use of prostaglandin F₂ alpha for early pregnancy termination in the mismated bitch. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.21, n.3, p.487-499, 1991.

ROMAGNOLI, S.E.; CAMILLO, F.; CELA, M.; JOHNSTON, S.D.; GRASSI, F.; FERDEGHINI, M. Use of prostaglandins F₂ alpha to induce early abortion in bitches: serum progesterone, treatment outcome and interval to subsequent oestrus. **J. Reprod. Fertil Suppl.**, v.47, p. 425-431, 1993.

ROMAGNOLLI, S.; CONCANNOM, P.W. **Clinica** use of progestins in bitches and queens: a review. In: CONCANNON, P.W., ENGLAND.; VERSTEGEN, J. **Recent advances in small animal reproduction**, 2003. Disponível em : <<http://www.ivis.org/>>. Acesso em: 15 fev. 2006.

ROMAGNOLI, S. Control of reproduction in dogs and cats: use and misuse of hormones. In: **WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION**, 31., 2006, Prague. **Proceedings...Prague**, 2006.

SCHALFER, D.H. Canine and feline abortion diagnostics. **Theriogenology**, v.70, p. 327-331, 2008.

SCHOTANUS, B.A.; GILER, G.; VAN DER LUGT, J.J.; OKKENS, A.C. Estrolium treatment in the bitch: a risk for uterine infection. **Reprod Domest. Anim**, v.43, p.176- 180, 2008.

SHAFER-SOMI, S. Establishment of canine pregnancy - new insights. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 6., 2008, Viena. **Proceedings...Viena**, 2008. p. 220-222.

SHIMIZU, T.; TSUTSUI, T.; MURAO, I.; ORIMA, H. Incidene for transuterine migration of the embryos in the dog. **Japanese Nippon Juigaku Zasshi**, v.52, p.1273- 1275, 1990.

SONGSASEN, N.; WILDT, D.E. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation system in the domestic dog. **Anim. Reprod. Sci.** v.98, p. 2-22, 2007.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento do embrião e códigos de qualidade. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Transferência de embriões, 3.ed, 1998 p. 172.

SUTTON, D. Oestrogens for mismating in the bitch. **Vet. Rec.** v.136, p. 596, 1995.

SUTTON, D.J.; GEARY, M.R.; BERGMAN, J.G. Prevention of pregnancy in bitches following unwanted mating: a clinical trial using low dose oestradiol benzoate. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl, v. 51, p.239-43, 1997.

SWANSON, W. F.; ROTH, T. L.; WILDT, D. E. In vivo embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. **Biol. Reprod.**, v.51, p.452-464, 1994.

TESORIEIRO, J.V. A morphologic, cytochemical and chromatographic analysis of lipidic yolk formation in the oocytes of the dog. **Gamete Res.**, v.6, p.267-279, 1982.

TESOURIERO, J.V. Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. **J. Morphology.**, v.168, n.2, p.171-179, 2005.

Tecnopec. Uso de diferentes tipos de estrógenos na IATF. **Boletim informativo**. Disponível em: <<http://www.tecnopec.com.br/index.php?aid=84>>. Acesso em 23 de ago. 2008.

TIBOLD, A.; THUROCZY, J. Differences in progesterone, estradiol, FSH and LH patterns in healthy, and progesterone treated hypoluteoid pregnant bitches. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 6., 2008, Vienna. **Proceedings**...Vienna, 2008. p.XXX .

TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl**; v. 339, p. 269-275, 1989.

TSUTSUI, T.; HORI, T.; OKAZAKI, H.; TANAKA, A.; SHIONO, M.; YOKOSUKA, M.; KAWAKAMI, E. Transfer of canine embryos at various development stages recovered by hysterectomy of surgical uterine flushing. **Theriogenology**, v.4, p.401-405, 2001.

TSUTSUI, T.; HORI, T.; ENDO, S.; HAYAMA, A.; KAWAKAMI, E. Intrauterine transfer of early canine embryos. **Theriogenology**, v.66, n.6-7, p. 1703-1705, 2006.

TSUTSUI, T.; MIZUTANI, W.; HORI, T.; OISHI, K.; SUGI, Y.; KAWAKAMI, E. Estradiol benzoate for preventing pregnancy in mismated dogs. **Theriogenology**, v.66, n. 6-7, p. 1568-1572, 2006

VERSTEGEN – ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. Endocrinology of pregnancy in the dog: A review. **Theriogenology**, v. 70, p.291-299, 2008.

WANKE, M.; LOZA, M.E.; MONACHESI, N.; CONCANNON, P. Clinical use of dexamethasone for termination of unwanted pregnancy in dogs. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.51, p. 233-238. 1997.

WANKE, M.; ROMAGNOLI, S.; VERSTEGEN, J.; CONCANNON, P.W. Pharmacological approaches to pregnancy termination in dogs and cats including the use of prostaglandins, dopamine agonists, and dexamethasone. In: CONCANNON, P.W.; ENLAND, G.; VERSTEGEN, J.R. **Recent Advances in Small Animal Reproduction**, Ithaca: International Veterinary Information Service, 2002. Disponível em: </http://www.ivis.org/>. Acesso em 15 fev. 2006.

WEISS, D.J.; KLAUSNER, J.S. Drug-associated aplastic anemia in dogs: eight cases (1984-1988). **J. AM. Vet. Méd. Assoc.**; v. 196, p. 472-475, 1990.

WESTON, S.A.; PARISH, C.R. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies: analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. **J. Immunol. Methods**, v. 133, p.87–97, 1990.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. Cell death during development. **J. Immunological Methods**, v. 265, p. 3-20, 2002.

Trabalho submetido para a revista *Ars Veterinária* data/...../.....

Efeito do benzoato de estradiol sobre o sistema hematológico de cadelas recém-acasaladas.

(Action of the benzoate estradiol on the hematologic system of the pregnancy bitches)

(Efecto del benzoate de estadiol sobre el sistema hematológico de perras recién acopladas)

A. A.P DERUSSI *⁶, V.H CHIRINÈA ⁷, G. H M ARAUJO ⁸, M. D LOPES ⁹

RESUMO

Inúmeras drogas são utilizadas para a prevenção da gestação em cadelas, com o mecanismo de ação dependente do estágio gestacional em que são utilizadas, a capacidade de induzir a morte fetal, a indução da absorção e/ou abortamento ou até mesmo da indução do parto. O uso de estrógenos na prevenção da implantação em cadelas é contra indicado devido aos efeitos colaterais graves que envolvem o sistema hematológico. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do benzoato de estradiol sobre o sistema hematológico de 12 cadelas recém-acasaladas, na dose de 0,2 mg/Kg, com aplicação intra-muscular, entre os dias 2 e 7 da data do último acasalamento. Essas fêmeas foram divididas em 3 grupos: GA – quatro cadelas que receberam o benzoato de estradiol entre os dias 2 e 3 após a última cobertura; GB – quatro cadelas em que o benzoato de estradiol foi aplicado nos dias 5 ou 6 da última cobertura e GC – quatro fêmeas cuja droga foi aplicada nos dias 6 ou 7 pós cobertura. A ocorrência de alterações

⁶ Autor para correspondência: Médica Veterinária. Mestranda do Departamento de Reprodução Animal, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. e-mail: ana_pagnano@yahoo.com.br.

⁷ Médica Veterinária, Doutoranda do Departamento de Reprodução Animal, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁸ Médico Veterinário, Doutorando do Departamento de Reprodução Animal, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁹ Médica Veterinária, Prof.a Adjunta do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária -FMVZ, UNESP, Botucatu. de Rubião Júnior, s/n, CEP 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil

hematológicas foi averiguada através da análise do hemograma em três momentos distintos: momento 1 (M1) antes da aplicação da droga, momento 2 (M2) quinze dias após a aplicação da droga e momento 3 (M3) quarenta dias após a aplicação. As variáveis analisadas foram: hemáceas/uL, hemoglobinas g/dL, volume globular, proteínas totais g/dL, plaquetas/ uL, leucócitos/ uL. Os dados foram analisados baseando-se nos valores das médias e desvios padrões, considerando $p < 0,05$. O benzoato de estradiol alterou os parâmetros referentes à hemoglobina ($p = 0,0366$) e volume globular ($p = 0,0493$) quinze dias (M2) após a aplicação da droga. O retorno aos parâmetros hematológicos normais ocorreu em todas as fêmeas tratadas, 40 dias após a aplicação da droga.

Palavras-chave: benzoato de estradiol, sistema hematológico, gestação, efeitos colaterais

ABSTRACT

Several classes of drugs have been used for the prevention of the pregnancy on the dog. Its mechanism of action depends on the gestation period, the capacity to produce the fetal death, the absorption and/or abortion or induction of the parturition. The use of estrogen in the interruption of the gestation is many times counter advised; side effects that involve the hematopoietic system are ascribed with the use of this drug. The objective of this study was to evaluate the action of the estradiol benzoate in the hematopoietic system of 12 bitches, that received an application of the drug for intramuscular injection in the dose of 0,2 mg/Kg, between days 2 to 7 for the date of the last mating. The occurrence of hematologic alterations due to the application of the drug, was inquired through the analysis of the complete hemogram at three distinct moments: moment 1 (M1) without application of the drug, moment 2 (M2) equivalent the 15 days after the application of the drug and moment 3 (M3) 40 days after the application of the drug. The data had been analyzed by the SAS program system, to comparing the averages using "Tukey test" with different variances ($p < 0,05$). The variable analyzed were: hemaceas/uL, hemoglobine g/dL, globular volume, total proteins g/dL, plaquets/ uL, leucócitos. Estradiol benzoate modify only parameters concerning hemoglobin ($p = 0,0366$) and globular volume ($p = 0,0493$) on the bitches that received the drug into the 4 and 5 days after mating, however the return on normal parameters occur all the bitches, 40 days afterwards the application the drug.

Key-words: estradiol benzoate, hematopoietic system, pregnancy, side effects

RESÚMEN

Inúmeras drogas son utilizadas para la prevención de la gestación en perras, con el mecanismo de acción dependiente del estagio gestacional en que son utilizadas, la capacidad de inducir la muerte fetal, la inducción de la absorción y/o aborto o hasta la inducción del parto. El uso de estrógenos en la prevención de la implantación en perras no es indicado a causa de los efectos colaterales graves que envuelven el sistema hematológico. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del benzoato de estradiol sobre el sistema hematológico de 12 perras recién acopladas en la dosis de 0,2 mg/Kg, con aplicación intramuscular, entre los días 2 y 7 de la fecha del último acoplamiento. Esas hembras fueron divididas en tres grupos: GA- cuatro perras que recibieron el benzoato de estradiol entre los días 2 y 3 después de coberturas; GB- cuatro perras en que el benzoato de estradiol, fue aplicado en los días 5 ó 6 después de la última cobertura y GC- cuatro hembras a las que la droga fue aplicada en los días 6 ó 7 después de la cobertura. La ocurrencia de alteraciones hematológicas fue averiguada a través del análisis del hemograma en tres momentos distintos: Momento 1 (M1) antes de la aplicación de la droga, momento 2 (M2) quince días después de la aplicación de la droga y momento 3 (M3) cuarenta días después de la aplicación. Las variables analizadas fueron: hemácias/uL, hemoglobinas g/dl, volumen globular, proteínas totales g/dl, plaquetas/uL y leucocitos/uL. Los datos fueron analizados basándose en valores de los promedios y desvíos patrones, considerando $p < 0,05$. El benzoato de estradiol alteró los parámetros referentes a la hemoglobina ($p = 0,0366$) y volumen globular ($p = 0,0493$) quince días después de la aplicación de la droga. La vuelta a los parámetros hematológicos normales ocurrió en todas las hembras tratadas, 40 días después de la aplicación de la droga.

Palabras claves: benzoato del estradiol, sistema hematológico, gestación, efectos colaterales

INTRODUÇÃO

A ocorrência de gestações indesejadas em cadelas é um fato comumente observado, principalmente quando consideramos que uma única cobertura é capaz de resultar em concepção. Diversas categorias de drogas são utilizadas para a prevenção da gestação na cadela, e o mecanismo de ação de cada fármaco depende do estágio gestacional em que são utilizadas, da capacidade de induzir a morte fetal, da absorção e/ou abortamento ou até mesmo da capacidade de indução do parto (HOFFMAN, 2004).

O uso do benzoado de estradiol, na prevenção da gestação nas cadelas é atribuído a sua ação embriotóxica, a sua capacidade de alterar o movimento migratório dos embriões nas tubas uterinas e a sua ação na prevenção das implantações (TSUTSUI et al., 2006). Entretanto, os compostos estrogênicos deixaram de ser utilizados na clínica reprodutiva, devido principalmente aos seus efeitos colaterais graves associados ao aparecimento de petéquias, sufusões e hemorragias graves observados alguns dias após a aplicação da droga (WEISS e KLAUSNER, 1990).

O mecanismo de ação do estrógeno sobre a medula óssea não é completamente conhecido, sabe-se, entretanto que após a administração desse fármaco há formações de colônias de macrófagos granulocíticas e fibroblásticas, cerca de 1 a 3 semanas após a aplicação da droga. Estudos *in vitro*, entretanto, não revelaram supressão da medula óssea (WEISS e KLAUSNER, 1990).

A principal alteração hematológica relacionada ao uso de estrógeno é uma anemia aplásica da medula óssea, onde se observa falência de todas as linhagens de células sanguíneas, associada à citopenias e substituição da medula hipocelular por tecido adiposo. Essa falência da medula óssea é uma das maiores causas da depleção das células sanguíneas, na circulação, sendo também denominada de aplasia das células vermelhas puras, agranulocitose ou trombocitopenia amegacariocítica (WEISS e KLAUSNER, 1990).

Também são atribuídos aos estrógenos outros efeitos colaterais, tais como a neoplasia mamária e a piometra. O período de ação dos estrógenos, classificados como longo ou curto, dependem do período de ligação da droga aos respectivos receptores nos tecidos alvo; essa característica está associada com a severidade dos efeitos colaterais, assim o dietilbestrol, o estradiol, a estrona, são considerados indutores de efeitos colaterais graves, pois ocupam os receptores por um período de tempo maior, de 7 a 10

dias. Já compostos como estriol, considerados de curta ação, apresentam efeitos colaterais mais leves (ROMAGNOLI, 2006). O benzoato de estradiol é considerado uma droga de curta duração, possuindo um período de meia vida de 3 dias.

De acordo com Lofstedt (2004), pesquisas estão sendo realizadas na tentativa de resgatar a popularidade do estrógeno exógeno como método contraceptivo, pois por muitos anos esta droga foi considerada ineficiente e insegura. Publicações recentes demonstram o uso de baixas doses de estrógenos em cadelas recém-acasaladas com resultados seguros e efetivos (LOFSTEDT, 2004; TSUTSUI, 2006).

Em vista da literatura consultada o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do uso de uma única aplicação de benzoato de estradiol (Estrogin[®])¹⁰, na dose de 0,2 mg/Kg, sobre o sistema hematológicos de cadelas, com histórico de cobertura indesejável.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 12 cadelas com histórico de cobertura indesejável, atendidas no Serviço de Reprodução de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP/Botucatu. Essas fêmeas, após discussão sobre a melhor forma de impedir essa possível gestação e o consentimento dos proprietários sobre a utilização da droga teste, receberam uma única aplicação de benzoato de estradiol, na dose de 0,2 mg/Kg, por via intramuscular, no período compreendido entre o 2º e 7º dia da data da última cobertura e foram ovariopalingohisterectomizadas em um período que variou entre 6 a 16 dias após a última cobertura.

Esses animais foram divididos em 3 grupos, conforme a data de aplicação do estrogênio: **Grupo A:** Constituído de quatro cadelas que receberam o benzoato de estradiol, no período entre o 2º e 3º dia da data da última cobertura; **Grupo B:** Quatro cadelas que receberam o benzoato de estradiol no período entre o 4º e 5º dia da última cobertura e o **Grupo C:** também formado por quatro cadelas que receberam o benzoato de estradiol, no período entre o 6º e 7º dia da última cobertura.

A ocorrência de alterações hematológicas foi avaliada em três momentos: **Momento 1 (M1)** antes da aplicação da droga, **Momento 2 (M2)** 15 dias após a aplicação da droga e **Momento 3 (M3)** 40 dias após a aplicação da droga.

¹⁰ Estrogin[®], Farmavet Produtos Veterinários, São Paulo

Foram coletadas amostras sanguíneas através de punção da veia jugular (1 a 2 ml), em tubos com EDTA, para a realização de hemograma, utilizando método automatizado. A contagem leucocitária e plaquetária foram realizadas e os valores de referência adotados para a comparação foram baseados nos descritos por Feldman et al (2000), sendo os mesmos adotados pelo do Laboratório Clínico do Hospital Veterinário-Unesp /Botucatu (FELDMAN et al., 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do benzoato de estradiol na prevenção de gestação em cadela recém-acasalada é uma forma de contracepção, que pode atuar de forma menos dispendiosa sobre o controle populacional dos cães, já que muitas vezes a implantação de um programa de controle animal através do uso de esterilização cirúrgica, além da alocação de recursos financeiros, técnicos e humanos, exige planejamento que englobe diagnóstico, ações preventivas, monitoramento, avaliação e dedicação permanente, seguindo as exigências da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Pesquisas recentes indicam que em média 95% das cadelas reprodutivamente normais que são acasaladas em seu período fértil tornam-se gestantes (REYNAUD et al., 2006). O tempo relativamente longo de permanência dos ovócitos nas tubas uterinas, associado à longevidade da capacidade fecundante dos espermatozóides e o rápido transporte espermático nos cornos uterinos sugerem que um único acasalamento é suficiente para produzir uma gestação.

Os valores dos hemogramas obtidos antes e após a aplicação do benzoato de estradiol em diferentes períodos após o acasalamento estão resumidos na tabela 1:

Tabela 1- Valores da média e desvio padrão referentes à contagem das hemáceas, hemoglobina, volume globular, proteínas totais, plaquetas e leucócitos dos grupos experimentais (**GA**, **GB**, **GC**) nos três momentos estudados **M1** (antes da aplicação da droga), **M2** (15 dias após a aplicação da droga) e **M3** (40 dias após a aplicação da droga) e valores de referência considerados. Botucatu, 2008, os mesmo adotados por Meinkoth e Clinkenberard (2000).

Valores de referência	Hemáceas (5,5 a 8,5 (X 10 ⁶ µL)	Hemoglobina (12 a 18 (g/dl)	Volume globular (37 a 55%)	Proteínas totais (6 a 8 (g/dl)	Plaquetas (180.000 µL)	Leucócitos (6- 17 (x 10 ³ µL)	
GA	Momento 1	6.500.000 ± 302.021 ^a	14,7 ± 0,70 ^a	44,25 ± 2,69 ^a	7,2 ± 0,45 ^a	247.500 ± 33.260 ^a	12.887,5 ± 1.391,7 ^a
	Momento 2	5.028.000 ± 1.484.552 ^a	14,675 ± 0,705 ^a	45 ± 3,49 ^a	7,5 ± 0,29 ^a	175.062,5 ± 53.210 ^a	11.200 ± 2.440,6 ^a
	Momento 3	6.152.500 ± 430.298 ^a	14,675 ± 0,85 ^a	44,75 ± 2,06 ^a	6,95 ± 0,33 ^a	185.162,5 ± 43.006 ^a	9.909,75 ± 1.840,2 ^a
	p	0,4351	0,9985	0,9388	0,2814	0,3973	0,5142
GB	Momento 1	6.795.000 ± 449.045 ^a	16,12 ± 1.09 ^a	47,25 ± 2,78 ^a	7,45 ± 0,36 ^a	204.050 ± 30.780 ^a	13.975 ± 1.031,5 ^a
	Momento 2	5.620.000 ± 511.468 ^a	13,17 ± 0,65 ^b	38 ± 2,04 ^b	7,1 ± 0,21 ^a	200.906,25 ± 89.580 ^a	12.400 ± 2.271,2 ^a
	Momento 3	6.200.000 ± 351.852 ^a	14,3 ± 0,70 ^{ab}	44,25 ± 1,18 ^{ab}	7 ± 0,39 ^a	222.031,25 ± 66.845 ^a	10.300 ± 1.347,2 ^a
	p	0,0780*	0,0366	0,0493	0,3364	0,9084	0,3700
GC	Momento 1	6.587.500 ± 139.963 ^a	15,8 ± 1.18 ^a	43,75 ± 2,46 ^a	7 ± 0,50 ^a	366.293,75 ± 138.658 ^a	14.775 ± 1.876,3 ^a
	Momento 2	5.827.500 ± 412.460 ^a	12,92 ± 0,70 ^a	38 ± 1,68 ^a	6,95 ± 0,62 ^a	304.562,5 ± 140.605 ^a	17.375 ± 2.330 ^a
	Momento 3	5.822.500 ± 376.837 ^a	13,65 ± 0,81 ^a	38,75 ± 2,59 ^a	7,32 ± 0,70 ^a	271.781,25 ± 66.298 ^a	11.500 ± 958,30 ^a
	p	0,1137	0,0661*	0,0505*	0,3716	0,3981	0,1385

Letras iguais significam sem diferença estatística e letras diferentes significam diferença estatística

Dos grupos avaliados na presente pesquisa, o GA – aplicação da droga no 2º ou 3º dia – não apresentou diferenças estatísticas entre os três momentos estudados, a despeito dos valores absolutos da maioria das variáveis apresentarem-se sempre inferiores nos momentos 2 e 3 quando comparados com o momento 1, ou seja, antes da aplicação da droga. Após a aplicação do benzoato de estradiol foi verificado uma diminuição nos valores absolutos de hemáceas, plaquetas e leucócitos, mas sem ultrapassar os limites normais da espécie.

O GB – uso do fármaco entre os dias 4 e 5 pós cobertura, foi observado uma diferença significativa entre os momentos 1 e 2 para as variáveis hemoglobina e volume globular, conforme visto na tabela 1. Tanto os valores de hemoglobina como de volume globular retornaram ao normal no momento 3, após 40 dias da aplicação da droga. Nesse grupo também foi constatado uma tendência da variável hemácea apresentar diferença expressiva entre os momentos M2 e M1 / M3. Esse resultado revela uma concordância com os estudos de Weiss e Klausner (1990), que identificaram um efeito rápido e transitório dos estrógenos sobre a linhagem sanguínea.

O GC – aplicação do benzoato de estradiol nos dias 6 e 7 pós cobertura indesejável, da mesma forma que no GB, foi evidenciado apenas uma tendência da hemoglobina e do volume globular em mostrarem resultados inferiores nos momentos 2 e 3 em relação ao momento 1.

No município de Botucatu a erliquiose canina é considerada endêmica, sendo uma das principais enfermidades infecciosas atendida na clínica médica de pequenos animais. A presença de sintomas clínicos e alterações laboratoriais inespecíficas como a trombocitopenia podem aumentar a suspeita da doença em caninos em áreas endêmicas. Na análise individual dos parâmetros hematológicos foi observado a ocorrência de uma diminuição dos valores plaquetários, 15 dias após a aplicação da droga (momento 2). Esse fato foi devidamente considerado como ação do benzoato de estradiol, sem entretanto, excluir a possibilidade da ocorrência de erliquiose associada em algumas cadelas, com o procedimento cirúrgico (OSH)

As alterações do VG e hemoglobina, observadas neste experimento, podem ser atribuídas a perdas sanguíneas decorrentes do processo cirúrgico, já que no momento 2, 15 dias após aplicação da droga, algumas fêmeas já tinham sido submetidas a OSH, no entanto, o retorno aos parâmetros hematológicos normais ocorreu em todas as cadelas do grupo experimental, conforme observado nas tabelas 1.

No M3 todas as fêmeas apresentaram hemograma dentro dos limites normais para a espécie, o que confirma mais uma vez os achados de Weiss e Klausner (1990).

A utilização do benzoato de estradiol na prevenção da implantação em cadela recém - acasalada é uma forma de contracepção e estudos sobre a dose, efeitos colaterais, aplicação em momento adequado do ciclo estral, poderiam intensificar o uso desse hormônio e aumentar sua eficácia. O estudo sobre o uso correto deste fármaco tem como intenção facilitar a utilização do produto, contribuindo diretamente para controle populacional de cães, especificamente em casos de coberturas recentes não desejadas.

O benzoato de estradiol é considerado uma droga de curta duração, possuindo um período de meia vida de 3 dias. Essa característica é benéfica pois o tempo de ligação com seus receptores é relativamente curto, gerando efeitos colaterais menos severos. De acordo com Bowen et al., (1985) a diferença entre doses utilizadas e número de repetições de aplicações do fármaco, a categoria de estrógeno utilizada, bem como o período de meia vida do fármaco, podem influenciar os resultados de prevenção de gestação como o aparecimento dos efeitos colaterais sobre o sistema hematológico.

Outra condição importante que deve ser considerada na hormonioterapia é a sensibilidade individual a determinados compostos e a severidade dos efeitos colaterais apresentar uma relação forte com a dose utilizada. A dose usada nesse experimento foi

determinada pelo estudo de Tsutsui et al., (2006), os quais correlacionaram o aparecimento de efeitos colaterais com a dose de benzoato de estradiol administrada em cadelas; a dose de 0,2 mg/kg foi considerada a dose de máxima eficiência, ou seja, a dose em que houve prevenção de 100% de gestação e ausência de efeitos colaterais.

Nenhum outro sintoma relacionado ao trato reprodutivo foi identificado nos animais estudados, embora o período de avaliação tenha sido relativamente curto para diagnosticar alterações uterinas e ou mamárias.

De acordo com os resultados obtidos nesse ensaio, o benzoato de estradiol, na dose recomendada torna-se uma opção viável de contracepção, podendo ser utilizada com segurança, principalmente em relação a um quadro de pancitopenia.

CONCLUSÃO:

A utilização do benzoato de estradiol, na dose de 0,2 mg/Kg, não promove alterações hematológicas quando aplicadas precocemente em cadelas acasaladas, o que entretanto, não exclui a necessidade de um rígido controle hematológico quando opta-se pelo uso do benzoato e estradiol na prevenção da implantação em cadelas.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CONCANNON, P.W. Contraception in the dog. **Vet Annual**, v. 35, p. 177-187, 1995.
- ENGLAND, G.C.W., et al. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. **Theriogenology**, 2006.
- FELDMAN, E.C & NELSON, R.W. **Canine and Feline endocrinology and reproduction**, Philadelphia, 2.ed, W.B. Saunders, 1996, 78 p.
- FELDMAN, B.F., et al. **Schalm's Veterinary Hematology**, Austrália, 5.ed, Blackwell Publishing, 2000, 1376 p.
- HOFFMAN, B. **Hormonal control of pregnancy and parturition in the dog**. In: 29th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, Rhodes, Grécia, 2004.
- JEFFCOATE, J. Physiology and Endocrinology of the bitch. In: Simpson, G; England, G; Harvey, M. **Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology**. British Small Animal Association, 1998, p. 1-9.
- LOFSTEDT, R. Applied reproductive physiology of bitches. Section A: The bitch. In: **A manual for Theriogenology**, 2004.
- LOFSTEDT R. Breeding management. Section C. In: **A manual for Theriogenology**, 2004.
- REYNAUD, k., et al. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review. **Theriogenology**, 2006.
- TSUTSUI, T., et al. Estradiol benzoate for prevent pregnancy in mismated dogs. **Theriogenology**., 2006.
- WEISS, D.J & KLAUSNER, J.S. Drug-associated aplastic anemia in dogs: eight cases (1984-1988). **J. AM. Vet. Med Assoc**; v. 196, p. 472-5, 1990.

Normas da Revista Ars veterinária

Itens de Verificação para Submissão

Como parte do processo de submissão, autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão com todas os itens listados a seguir. Serão devolvidas aos autores as submissões que não estiverem de acordo com as normas.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, justificar em "Comentários ao Editor".
2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapasse os 2MB)
3. Todos os endereços de páginas na Internet (URLs), incluídas no texto (Ex.: <http://www.ibict.br/>) estão ativos e prontos para clicar.
4. O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.
6. A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em Asegurando a Avaliação por Pares Cega