

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP – BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**INDUÇÃO DO ESTRO EM CADELA (*Canis
familiaris*): ASPECTOS CLÍNICO,
COMPORTAMENTAL E HORMONAL**

MOISÉS CALVO DE PAULA

**Botucatu – SP
maio/2009**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP – BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INDUÇÃO DO ESTRO EM CADELA (*Canis familiaris*): ASPECTOS CLÍNICO, COMPORTAMENTAL E HORMONAL

MOISÉS CALVO DE PAULA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Botucatu, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Adj. Maria Denise Lopes

Nome do Autor: Moisés Calvo de Paula

Título: INDUÇÃO DO ESTRO EM CADELA (*Canis familiaris*): ASPECTOS CLÍNICO, COMPORTAMENTAL E HORMONAL

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Eunice Oba
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
Universidade de Franca – UNIFRAN – Franca

Data da Defesa: 26 de maio de 2009.

Dedicatória

A história de uma pessoa é escrita com base nas influências de muitas outras. Alguns não têm a sorte de conhecer influências positivas, mas eu não, Deus sempre foi muito generoso comigo e, em cada momento de minha vida, ali estava um anjo enviado por Ele.

De maneira metafórica, a vida é como construir uma casa, em que cada etapa de sua construção tem influência direta na estrutura.

A minha “casa” tem o mais forte dos alicerces, Deus, e é sobre Ele que minha vida está sendo construída.

No decorrer dessa “obra”, foi sempre assim e, desde meu nascimento, em que na falta de um pai, Deus me deu uma mãe, guerreira, dedicada, sempre pronta a me apoiar, que me dá carinho e me ensina que mãe é muito mais do que gerar, é na verdade um dom de Deus. Minha mãe são as paredes, que estão sempre ali para me proteger de todas as adversidades que, porventura, venham a me atrapalhar. É onde estão as janelas que nos mostram como é o mundo do lado de fora e como é bom o aconchego do lar, especialmente quando esse mundo externo nos apresenta obstáculos.

Embora forte, uma parede precisa de pilares, prontos para darem sustentação à casa, assim são meus queridos avós, Clemente e Inês, que durante toda minha vida não mediram esforços para me sustentar, me oferecendo os pilares da educação, pois, sem eles, eu jamais teria concluído minha graduação e também esse mestrado. Eles são exemplo de seres humanos com princípios

íntegros e tudo o que conquistei e o que virei a conquistar devo grande parte a eles.

Meu irmão Matheus é meu grande amigo e umas das pessoas mais determinadas que conheço. Com ele não tem tempo ruim, sei que está a todo momento torcendo para minha felicidade, assim como a recíproca é também verdadeira. Não importa se faz sol ou chuva, frio ou calor, ele está sempre tentando manter o ambiente interno agradável, ou seja, na minha casa ele é o telhado.

Bom, a casa já tem alicerce, paredes, pilares e telhado, estrutura capaz de suportar todas as dificuldades. Mas falta um morador, e Deus mais uma vez me presenteou com um anjo, ou melhor, uma anjinha cujo nome é Maura. É ela a dona da casa, quem coloca ordem, quem reforma o que não está direito, muda uma coisa aqui outra ali, mas sempre na intenção de deixar a casa mais bonita. A Maura também é pra mim um grande exemplo de ser humano e, com certeza, tem papel fundamental em minha vida e em mais essa conquista.

Com a casa construída, faltam os acabamentos e esses, espero que jamais terminem, pois muitas pessoas passaram e ainda passarão pela casa, deixando algo de importante.

Dentre essas pessoas, gostaria de citar duas em especial, que me deram a oportunidade de hoje estar concluindo essa dissertação, as professoras Fabiana e Denise. A Fabiana foi quem me fez despertar para essa área, quem me mostrou a verdadeira função de um professor, o ensinar, não apenas com teoria, mas principalmente com exemplos, sejam eles profissionais ou pessoais.

Com a Denise, além de todo conhecimento teórico, aprendi que as pessoas boas são aquelas que mesmo em posição hierárquica superior permanecem humildes e sempre dispostas a ensinar e a contribuir com o crescimento daqueles que o cercam.

Certa vez li: “A marca mais importante que existe é a marca que deixamos na história de cada um que conhecemos. Esta marca que deixamos para o outro tem um nome: exemplo”.

Esta frase ilustra bem como as pessoas contribuem para o meu crescimento, já que, sempre aprendi muito mais com os exemplos do que, simplesmente, com palavras. Dessa maneira, gostaria de agradecer e dedicar esse trabalho a Deus e a todos os anjos enviados por Ele, que, mesmo sem perceberem, estavam ajudando na construção e acabamento de minha casa, ou melhor, de minha vida.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por estar sempre ao meu lado e me guiar em todas as vitórias até agora obtidas.

Aos meus familiares que são os grandes responsáveis pelo meu crescimento como ser humano, em especial à minha mãe Silvia, que eu amo muito, meus queridos avós, Clemente e Inês e ao meu grande amigo e, graças a Deus, irmão Matheus.

À minha noiva e futura esposa Maura, por todos esses anos de convivência que, com certeza, foram os melhores de minha vida. Te amo!

À professora e querida orientadora Maria Denise Lopes por ter acreditado em mim, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho e por nunca medir esforços para que esse sonho se tornasse realidade. Obrigado por tudo!

À amiga e professora Fabiana Ferreira de Souza por ter me ensinado as primeiras lições e por todo apoio que sempre me ofereceu. Essa conquista também é sua.

Às amigas do Laboratório (REPAS) Vivi, Guta, Bethania e Ana Isabel por toda ajuda, amizade e convivência em harmonia, peças fundamentais em um ambiente de trabalho.

Aos docentes responsáveis pelo Departamento de Reprodução Animal, João Pinheiro Ferreira, Nereu Carlos Prestes, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Cezinande de Meira, Frederico Ozanan Papa, Sony Dimas Bicudo, Marco Antonio Alvarenga e, em especial, professora Eunice Oba, pela importante ajuda na realização das dosagens hormonais.

A todos os pós-graduandos do Departamento de Reprodução Animal, Carmo, Cely, Claudinha, Carla, Bruna, Wolff, Rodolfo, Marcel, Bruno, André, Gustavo, Daniel, Duroc, Ian, Ieda, Jeanne, Leandro, Rodrigo, Thiago, Luís, Zé e Camila.

Aos funcionários do Departamento, especialmente, Valter, Cris, Edílson e Dona Raquel pela amizade e convívio.

À Profa. Luzia Trinca por ter realizado as análises estatísticas sem as quais os resultados não seriam possíveis.

Obrigado a todos vocês!

Sumário

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. CICLO ESTRAL NA CADELA.....	03
2.2. PARTICULARIDADES REPRODUTIVAS DA CADELA.....	04
2.2.1. Duração do intervalo interestrál.....	04
2.2.2. Alta concentração de progesterona.....	04
2.2.3. Início da receptividade sexual.....	05
2.2.4. Inversão na esteroidogênese.....	05
2.2.5. Ovulação após pico de LH.....	06
2.3. INDUÇÃO DO ESTRO NA CADELA.....	07
2.4. FÁRMACOS UTILIZADOS PARA INDUZIR O ESTRO NA CADELA.....	09
2.4.1. Inibidores da prolactina.....	09
2.4.2. Prostaglandinas e análogos.....	14
2.4.3. GnRH, agonistas e superagonistas do GnRH.....	14
2.4.4. Gonadotropinas.....	15
2.4.5. Estógeno.....	16
2.5. PRINCIPAIS PROTOCOLOS UTILIZADOS NA INDUÇÃO DO ESTRO NA CADELA.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO.....	47
7. REFERÊNCIAS.....	48
8. TRABALHO CIENTÍFICO.....	53

PAULA, M.C. **Indução do estro em cadela (*Canis familiaris*): aspectos clínico, comportamental e hormonal**. Botucatu, 2009. 76p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

A cadela apresenta particularidades no ciclo estral e, o conhecimento de tais características é fundamental para a implantação de técnicas de reprodução assistida. A indução do estro é uma importante ferramenta tanto em pesquisas quanto no manejo reprodutivo de canis. Portanto, o presente trabalho utilizou um agonista da dopamina – cabergolina – 105 -120 dias após o final do estro na dose de 5µg/Kg por no máximo 15 dias ou até a fêmea apresentar sinais de estro, a fim de induzir e acompanhar os estros, espontâneo e induzido em cadelas, desde o início do proestro até o final do estro. As fêmeas foram divididas em 2 grupos: controle (espontâneo) e experimental (induzido). Amostras de sangue para a dosagem de progesterona e esfregaço vaginal foram coletadas a cada 2 dias, além de, observação dos sinais clínicos e comportamentais. Todas as 5 fêmeas do grupo experimental responderam ao tratamento com cabergolina em média após 42,6 dias, sendo que em 2 fêmeas essa resposta foi mais rápida e ambas apresentaram sinais de estro antes do final do tratamento. Ademais, o Intervalo Interestral (IIE) foi menor nas fêmeas do grupo experimental, 159 ± 15.01 , em relação às do grupo controle, 169 ± 13.43 dias. O perfil da progesterona e o padrão citológico não apresentaram diferenças entre os grupos estudados bem como os sinais clínicos e comportamentais. Em suma, a cabergolina pode ser empregada como agente indutor do estro na cadela, a fim de diminuir o IIE e facilitar o manejo reprodutivo.

Palavras chave: indução do estro, cabergolina, cadela.

PAULA, M.C. **Oestrus induction in the bitch (*Canis familiaris*): clinical, behavioral and hormonal aspects**. Botucatu, 2009. 76p. Master`s Degree Thesis – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo State University – UNESP.

Abstract

The bitch presents certain peculiarities in her estrus cycle that makes the knowing of such differences a sine qua non condition to the ones that want to implement assisted reproduction techniques. The estrus induction is an important tool not only for researches but also for kennels' reproductive managements. Hence this present study has used the cabergoline, which is a dopamine agonist, from 105 to 120 days after the end of the estrus at 5µg/Kg until the bitch presented estrus signs (maximum of 15 days of injection). Both spontaneous and induced estruses were observed from the beginning of proestrus until the end of estrus. Bitches were divided into 2 groups: control (spontaneous) and experimental (induced). Blood samples to check progesterone levels and vaginal smears were taken every 2 days, and clinical signs and behavioral changes were also observed and taken into consideration. All 5 females from the experimental group responded to the cabergoline treatment (42,6 days), but 2 bitches responded earlier than that and both presented estrus signs before the end of the treatment. Not only that but also the interestrus interval (IEI) was shorter for the bitches in the experimental group, $159 \pm 15,01$, if compared to the control group, $169 \pm 13,43$ days. The progesterone profile and the cytological standard did not present any difference among the studied groups, and so happened to the clinical and behavioral signs. To sum up, cabergoline can be used as a tool to induce estrus in bitches in order to reduce the IEI and facilitate the reproductive management.

Keywords: estrus induction, cabergoline, bitch.

1. Introdução

No reino animal, existem dois tipos de ciclos reprodutivos conhecidos: o ciclo estral e o ciclo menstrual. Os animais domésticos, como a cadela, apresentam períodos limitados de receptividade sexual. Essa limitação classifica-os como animais de ciclo estral. Por outro lado, os animais que são receptivos durante a maior parte do ciclo reprodutivo são classificados como animais de ciclo menstrual, incluindo os primatas e os seres humanos (CUNNINGHAM, 1999).

O entendimento do ciclo reprodutivo e de suas particularidades torna-se fundamental na implantação de qualquer técnica de reprodução assistida. Portanto, conhecer o histórico reprodutivo das fêmeas e entender o mecanismo responsável por cada fase, bem como suas transições, facilitam no momento de se adotar procedimentos que visem à maximização do desempenho reprodutivo.

A indução do estro é uma das técnicas utilizadas na maximização da eficiência reprodutiva das fêmeas domésticas e, ano após ano, vem sendo cada vez mais solicitada, principalmente por criadores. A indução do estro nas cadelas pode ser realizada por meio de medicamentos que estimulem o eixo hipotálamo-hipófise, os ovários ou ainda por grupos farmacológicos que inibam a prolactina (CONCANNON, 1993^a). Além disso, existe o aspecto social envolvido na indução do estro em cadela, observado quando fêmeas em estro induzem a ciclicidade ovariana de outras cadelas (CONCANNON, 1986). Tem-se estudado também o efeito do fotoperíodo na indução de um novo ciclo folicular na cadela, porém, existem poucas evidências que confirmem essa teoria (CONCANNON, 1993^a).

A técnica de indução do estro nas cadelas tem como indicações principais: tratamento do anestro primário e secundário; diminuição do intervalo interestral, a fim de se aumentar o número de filhotes nascidos em um ano, atendendo melhor a exigência do mercado; indução de um novo ciclo quando uma cobertura anterior não foi possível ou perdida, seja por indisponibilidade de um macho ou por um estro silencioso; facilitar o manejo reprodutivo e possibilitar a implantação de técnicas de reprodução assistida, tanto para o cão doméstico como para os carnívoros silvestres, principalmente aqueles em

extinção e o tratamento da piometra quando realizado clinicamente (JOHNSTON, et al., 2001).

Os protocolos de indução do estro na cadela, embora eficazes, ainda não estão completamente elucidados quanto aos mecanismos responsáveis pelo início de uma nova fase folicular, uma vez que o evento responsável pela transição do anestro para o proestro não é totalmente conhecido (CONCANNON e VERSTEGEN, 1997). Além disso, muitos fármacos não são aprovados para o uso em pequenos animais, dificultando, assim, o emprego de alguns protocolos.

2. Revisão de Literatura

2.1. Ciclo estral na cadela

A fêmea canina é um modelo fisiológico reprodutivo único dentre todas as outras espécies domésticas, pois algumas características reprodutivas são particulares da espécie.

As cadelas são classificadas como monoéstricas, predominantemente não sazonais, ou seja, apresentam um ciclo anual independentemente da época do ano, com intervalos interestrals de 6-7 meses, em média (SOKOLOWSKI, 1977). Contudo, algumas raças, tais como o Dingo Australiano e Basenji Africano, demonstram sazonalidade reprodutiva (BELL e CHRISTIE, 1971).

A puberdade é definida como o período inicial de capacidade reprodutiva. Para as cadelas, esse período é reconhecido como o início do primeiro proestro (SOKOLOWSKI, 1977), que normalmente ocorre entre os cinco e 10 meses de idade, podendo variar de 18 a 24 meses, de acordo com a raça, tamanho e peso (FELDMAN e NELSON, 2004), embora, em estudo conduzido por Wildt et al. (1981), não tenha sido observada uma relação do peso e a idade com o aparecimento do primeiro proestro.

Segundo Feldman e Nelson (2004), a cadela apresenta ciclos estrais regulares entre dois e seis anos de idade, isto é, nessas idades, a cadela apresenta o maior índice de fertilidade, caracterizando o melhor período reprodutivo nessas fêmeas.

O ciclo estral pode ser classificado quanto às características fisiológicas, endócrinas e comportamentais, que sofrem alterações, fase após fase. De acordo com Feldman e Nelson (2004), o ciclo estral das cadelas é composto por quatro fases: proestro, estro, diestro e anestro, sendo que o período de receptividade sexual inicia-se no final do proestro e estende-se até o final do estro.

2.2. Particularidades reprodutivas da cadela

2.2.1. Duração do intervalo interestral (IIE)

A cadela apresenta o ciclo estral mais longo dentre todas as outras espécies domésticas, podendo durar até 10 meses, ou seja, um intervalo interestral (IIE) que pode chegar até quase um ano, sendo que esse período é observado tanto em fêmeas gestantes como não gestantes (JEFFCOATE, 1993). Esse período longo ocorre devido à fase de diestro, fase de domínio progesteronal, em que o corpo lúteo apresenta, em média, uma sobrevivência de 63 dias nas cadelas prenhes e 100 dias nas não gestantes (LACROIX, 2004), associado a uma fase de anestro, obrigatório, que, em média, dura cerca de dois a três meses, o que também contribui para um período de interestro longo nessa espécie (JEFFCOATE, 1993).

Okkens e Kooistra (2006) descreveram que o período do anestro influencia diretamente o IIE e que sua duração varia de animal para animal e entre raças. Essas diferenças tornam a duração do anestro uma característica genética individual e racial, visto que animais da mesma raça tendem a apresentar um período médio do anestro similar, porém, ainda assim existem as diferenças individuais.

Outra singularidade da cadela e que contribui para um ciclo estral longo é a necessidade de um período de dois a dois meses e meio, após o diestro, para que ocorra uma regeneração endometrial, isto é, a cadela necessita desse período de quiescência reprodutiva – correspondente ao anestro – para que um novo ciclo seja iniciado e o processo de implantação possível (GÜNZEL-APEL et al., 2006).

2.2.2. Alta concentração de progesterona

Os altos níveis plasmáticos de progesterona são observados nas fêmeas gestantes e não gestantes, pois nas duas condições existe a presença do corpo lúteo iniciando a síntese de progesterona, a qual se eleva gradativamente até o 30º dia do diestro, a partir daí apresenta um declínio na sua concentração (CONCANNON, 1983). Essa alta concentração de progesterona é essencial para a manutenção da gestação, porém, nas fêmeas

não gestantes, essa condição impede o início de um novo ciclo, visto que a progesterona inibe o eixo hipotálamo-hipófise.

Sabe-se, desde a década de 90, que alguns hormônios, como a prolactina, são capazes de manter o corpo lúteo, sendo que, na cadela, esse hormônio é considerado o principal hormônio luteotrófico (OKKENS et al., 1990). A prolactina alcança os níveis plasmáticos mais elevados durante o diestro, auxiliando, assim, a manutenção do corpo lúteo, que continua sintetizando progesterona (JEFFCOATE, 1993). A exemplo das fêmeas em gestação, as cadelas não gestantes também passam pelos mesmos eventos hormonais, o que explica o longo intervalo interestral observados nessas fêmeas (LACROIX, 2004).

2.2.3. Início da receptividade sexual

Os primeiros sinais da fase folicular na cadela iniciam-se com o proestro, consequência do crescimento folicular, juntamente com a síntese de estrógeno, que é secretado pelas células foliculares (BELL e CHRISTIE, 1971; FELDMAN e NELSON, 2004). Apesar disso, a cadela não apresenta receptividade ao acasalamento, como ocorre nas outras espécies domésticas (RAYMER et al., 1986). Na cadela, a receptividade só ocorrerá a partir do momento em que os níveis de estrógenos começarem a declinar e as concentrações de progesterona a se elevar, o que acontece na fase de estro (CONCANNON e HANSEL, 1975).

2.2.4. Inversão na esteroidogênese

No final do proestro, os níveis de estrógeno já atingiram seu pico máximo e, nesse momento, ocorre uma diminuição na síntese de estrógeno e os níveis de progesterona começam a se elevar. Isso acontece devido ao processo de luteinização pré-ovulatória das células foliculares. Tal mudança no perfil hormonal é denominada de inversão da esteroidogênese, fundamental no processo de ovulação, haja vista o estímulo do pico pré-ovulatório do Hormônio Luteinizante (LH) (LUZ, 2004). No entanto, ainda existem discordâncias a respeito do fator responsável pelo estímulo da onda pré-ovulatória de LH. Para Wildt et al. (1979), o surgimento da onda pré-ovulatória de LH ocorre após o

pico pré-ovulatório do 17β -estradiol, assim como em outras espécies, na humana e na ovina. Em contrapartida, Concannon (1993^a) afirma que o surgimento da onda pré-ovulatória de LH está associado com a diminuição da concentração plasmática do 17β -estradiol, o que acontece em torno de 24-48 horas antes do pico pré-ovulatório de LH.

De qualquer maneira, sabe-se que a diminuição de estrógeno e aumento consequente de progesterona são responsáveis pela receptividade da fêmea observada na fase do estro (FELDMAN e NELSON, 2004).

O LH é o hormônio responsável pela maturação final dos folículos e pela ovulação, sendo que na cadela esse último evento ocorre cerca de dois a três dias após a onda pré-ovulatória de LH (JOHNSTON et al., 2001).

As células foliculares, durante seu desenvolvimento, adquirem características de células do corpo lúteo, dentre as quais a capacidade de sintetizar progesterona. Essa mudança funcional é importante, pois essas células passam de produtoras de estrógeno para células produtoras de progesterona, o que inicia o processo de inversão da esteroidogênese, responsável pelo pico de LH (LACROIX, 2004).

2.2.5. Ovulação após pico de LH

Os mecanismos que controlam a ovulação na cadela são diferentes das outras espécies, bem como o processo de ovulação, que não ocorre, necessariamente, junto com a receptividade sexual. Na cadela, a ovulação pode ocorrer alguns dias antes ou alguns dias após a fêmea estar receptiva, ou seja, o fato da cadela aceitar o acasalamento não indica que as ovulações já tenham ocorrido (FELDMAN e NELSON, 2004).

Em contrapartida, sabe-se que, de dois a três dias após o pico pré-ovulatório de LH, os folículos ovarianos da cadela começam a liberar os ovócitos. O processo de ovulação pode durar de 24 a 48 horas, pós-pico de LH (JOHNSTON et al., 2001).

Apesar das ovulações ocorrerem de maneira contínua por até 48 horas, existe a necessidade de um período para a maturação ovocitária, nuclear e citoplasmática que pode durar cerca de 24 a 48 horas. Portanto, na cadela, os ovócitos recém-ovulados precisam de um período de maturação

para que a segunda meiose se complete, estando, assim, aptos à fertilização espermática (ENGLAND e CONCANNON, 2001).

2.3. Indução do estro na cadela

Atualmente, tem-se discutido muito a respeito de quais são os fatores responsáveis pelo início de um novo crescimento folicular na cadela. Dessa maneira, alguns estudos vêm sendo realizados na tentativa de se estabelecer um protocolo de indução do estro, que seja seguro e eficaz. Apesar disso, o mecanismo responsável por induzir um novo ciclo ainda não está totalmente reconhecido, uma vez que os eventos envolvidos na transição do anestro para o proestro não estão completamente elucidados (CONCANNON, 1983).

De acordo com Concannon e Verstegen (1997), a transição natural do anestro para o proestro envolve alguns eventos como a elevação pulsátil da secreção de GnRH e de LH por vários dias, desencadeando um aumento nos níveis de FSH e, conseqüentemente, crescimento folicular, iniciando um novo ciclo. Por outro lado, Kooistra et al. (1999) pontuam que essa transição, do anestro para o proestro, está associada ao aumento da concentração plasmática de FSH sem um aumento concomitante de LH. Dessa maneira, o aumento circulante de FSH parece ser o evento principal para que uma nova fase folicular se inicie, ou seja, quando a concentração plasmática de FSH aumenta durante o anestro dá-se início a uma nova onda de crescimento folicular e a um novo proestro.

Estudos baseados na indução do ciclo estral por meio de anti-prolactínicos demonstraram que a prolactina participa dos mecanismos responsáveis pela manutenção do corpo lúteo e, conseqüentemente, faz com que a síntese de progesterona ocorra durante um período maior do que em outras espécies. A prolactina também atua inibindo o eixo hipotálamo-hipófise durante o anestro, o que leva a um aumento no intervalo interestral (VESTERGEN et al., 1993). Portanto, os anti-prolactínicos têm sido utilizados na tentativa de diminuir o intervalo interestral e, assim, induzir um novo ciclo. Desse modo, pode ser hipotetizado que, em certo momento do anestro, a elevação nas concentrações FSH poderá exceder o valor limite da maioria dos

folículos da reserva – folículos antrais – do ovário, provocando um estímulo para o desenvolvimento desses folículos. Um dos principais efeitos do FSH é a aquisição de receptores de LH nas células da granulosa. Após essa fase, o LH é progressivamente capaz de substituir o FSH na maturação folicular (GIER et al., 2008).

Além das modificações acima mencionadas no eixo hipotálamo/hipófise/ovário, há evidência do envolvimento de fatores dopaminérgicos no início de uma nova fase folicular. A administração de agonistas dopaminérgicos está associada à inibição de prolactina e ao encurtamento do intervalo interestrual (CONCANNON, 1993^b; GOBELLO et al., 2006^a; BEIJERINK et al., 2003). Apesar da inibição da prolactina causada pela bromocriptina, o encurtamento do anestro nas cadelas está também associado a uma rápida elevação do FSH, sem um aumento concomitante do LH (GIER et al., 2008).

Outro fator importante nessa transição e que influencia diretamente a indução do estro fértil é o período necessário para a regeneração endometrial. Portanto, um tratamento de indução de estro realizado antes do anestro pode provocar falhas ovulatórias, desencadeando um estro não fértil (ROMAGNOLI et al., 1993).

Tem-se discutido também a influência ou não do fotoperíodo e dos feromônios na indução do estro, como ocorre em outras espécies. Na cadela, o ciclo estral ocorre durante todos os meses do ano, não demonstrando nenhuma sazonalidade, o que indica pouca influência do ambiente no ciclo reprodutivo (BOUCHARD et al., 1991). Alguns animais criados em ambientes livres tendem a apresentar uma sazonalidade reprodutiva, porém, a influência do ambiente no controle neuroendócrino reprodutivo dessas fêmeas não é conhecida, embora Andersen e Simpson (1973) relatem que o número de estros durante o primeiro semestre do ano é cerca de duas vezes maior em relação ao período de julho a dezembro.

Existem algumas raças, como o Basenji, que apresentam ciclos modulados pela sazonalidade, sendo, aparentemente, comandados pelas mudanças de fotoperíodo, quando o início do ciclo ocorre no inverno, estação que apresenta menor intensidade de luz (CHRISTIANSEN, 1984).

O convívio social entre várias fêmeas durante o proestro e estro – quando há liberação de feromônios – tem sido correlacionado com a estimulação do eixo hipotálamo-hipófise, sendo possível observar fêmeas que, inicialmente, encontravam-se em anestro, apresentando sinais de cio. Esses resultados corroboram a influência dos feromônios na estimulação do eixo hipotálamo-hipófise e, conseqüentemente, na indução de cio (CONCANNON, 1993^a).

A influência do fotoperíodo e dos feromônios na estimulação de um novo ciclo parece ser mais importante em algumas raças específicas (CONCANNON, 1993^a).

2.4. Fármacos utilizados para induzir o estro na cadela

Existem muitos protocolos indicados para induzir o estro nas cadelas, porém, de acordo com Concannon e Verstegen (1997), esses protocolos ainda não foram suficientemente testados para tornarem-se uma prática comum, visto que, além da dificuldade em realizar o tratamento, muitas vezes, esses protocolos são caros, o que limita sua indicação.

Outra limitação ao se estabelecer um protocolo de indução do estro nas cadelas é que alguns dos medicamentos utilizados na preparação desses protocolos não são legalmente aprovados ou licenciados em muitos países (CONCANNON e VERSTEGEN, 1997).

Segundo Kutzler (2005), dentro dos protocolos indicados, os principais grupos farmacológicos que estimulam à indução do estro nas cadelas são: os inibidores da prolactina, tanto os agonistas da dopamina, como os antagonistas da serotonina; as prostaglandinas e análogos; GnRH, agonistas e superagonistas do GnRH; as gonadotropinas e os estrógenos. Ainda segundo o mesmo autor, a eficácia do tratamento e a indução de um estro fértil são bastante variáveis, dependendo do protocolo utilizado e da fase do ciclo estral que o tratamento for realizado.

2.4.1. Inibidores da prolactina

Para entender a ação dos antiprolactínicos, é importante saber que a síntese de prolactina é controlada pela conversão de serotonina em prolactina, ou seja, a serotonina é a precursora da prolactina. Ademais, a ação da dopamina também interfere nessa conversão, já que é capaz de inibi-la. Portanto, se um medicamento tem ação contrária à serotonina ou similar à dopamina, provocará a inibição da prolactina. (CONCANNON e VERSTEGEN, 1997).

Anteriormente, acreditava-se que a inibição da prolactina era necessária para a indução da foliculogênese, já que cadelas que não respondiam à terapia com o uso de agonistas dopaminérgicos também não apresentavam diminuição da concentração de prolactina (CONCANNON, 1993^b). Entretanto, sabe-se que a concentração de prolactina durante o final do anestro não se difere da concentração encontrada no início do proestro (OLSON et al. 1982). Essa afirmação também foi observada por Spattini et al. (2007), que relataram que a concentração de prolactina apresentou uma alta variabilidade entre os animais pesquisados, o que levou a acreditar que esse hormônio não apresenta um papel importante no controle da foliculogênese nas cadelas.

Os antiprolactínicos, como a metergolina, a bromocriptina e a cabergolina, são alcalóides derivados do ergot. Contudo, apenas a cabergolina tem alta especificidade aos receptores dopaminérgicos (D₂) (RAINS et al. 1995), dessa forma, é o que tem apresentado os melhores resultados, além de ser o mais seguro, pois apresenta os menores efeitos colaterais no sistema nervoso central. Esses receptores estão localizados nas células lactotróficas e no hipotálamo (FIENI et al., 1999).

Dentro do grupo farmacológico dos antiprolactínicos, estão: os agonistas da dopamina (cabergolina e bromocriptina) e os antagonistas da serotonina (metergolina).

Os principais agonistas da dopamina utilizados em cadela são a bromocriptina e a cabergolina (ONCLIN e VESTERGEN, 1997) e ambos têm ação na supressão da prolactina e, conseqüentemente, impedem que o corpo lúteo seja mantido por um período extremamente longo, uma vez que ela é

luteotrófica. Essa ação desencadeia uma diminuição da concentração de progesterona conforme a atividade do corpo lúteo diminui (OKKENS et al., 1997^b).

Devido a essa ação antiprolactínica, os agonistas da dopamina têm sido utilizados também na prevenção de piometra e no tratamento pré-cirúrgico de mastectomia, diminuindo o tamanho da glândula mamária e também a incidência desses tumores em fêmeas com pseudogestação (NOTHLING et al., 2003).

Mesmo com as recentes pesquisas realizadas para se determinar o mecanismo responsável pela indução do estro e diminuição do intervalo interestral, em decorrência do uso de agonistas da dopamina (ex: bromocriptina e cabergolina), muitas hipóteses ainda não foram esclarecidas. Entretanto, sabe-se que a indução do estro com a cabergolina, realizada no diestro, diminui o intervalo interestral em virtude da diminuição da progressão da fase lútea (OKKENS et al., 1997^a).

Essa eficácia dos agonistas da dopamina foi relatada em um trabalho realizado por Beijerink et al., (2003), com o intuito de avaliar três protocolos diferentes no encurtamento do intervalo interestral. Para tal, foram utilizadas três doses de bromocriptina, 5, 20 e 50µg/Kg, as quais eram administradas duas vezes ao dia até que o estro fosse induzido.

Os resultados desse trabalho demonstraram que os três protocolos foram eficazes na indução de um novo proestro, sendo que o intervalo interestral foi, significativamente, reduzido quando comparado ao grupo controle, em que as fêmeas não foram tratadas. Apesar disso, os autores pontuaram que, embora a indução tenha sido alcançada, a concentração de prolactina dos animais do grupo tratado com 5µg/Kg não foi diferente da concentração do grupo controle.

Isso sugere que o mecanismo responsável pelo início de uma nova fase folicular não está totalmente ligado à concentração de prolactina, mas sim a algum efeito da dopamina no eixo hipotálamo-hipófise.

O emprego da bromocriptina no tratamento da indução do estro também aumenta a concentração plasmática de FSH e, conseqüentemente, o desenvolvimento folicular. Esse aumento de FSH ocorre sem qualquer alteração na concentração de LH. Esses eventos endócrinos são similares aos

ocorridos no final do anestro de cadelas não tratadas (KOOISTRA et al. 1999). Dessa maneira, a hipótese de que os agonistas da dopamina têm efeitos no hipotálamo é reforçada.

Em outro estudo, Beijerink et al. (2004) utilizaram a metergolina em baixas doses, as quais não foram capazes de induzir um novo proestro, apesar de terem promovido a diminuição das concentrações de prolactina. Essa informação mostra que o efeito indutor de estro por ação dos agonistas da dopamina parece ser devido à estimulação direta do eixo hipotálamo-hipófise e/ou ação periférica nos ovários (GOBELLO, 2006^a).

Ao contrário do estudo anterior, quando administrada em altas doses (12,5 µg/Kg, intramuscular, a cada três dias até o início do proestro), a indução foi obtida (KUTZLER, 2007).

Outro importante fator a ser destacado em relação aos protocolos de indução do estro é o período de início do tratamento, visto que devem ser respeitados alguns parâmetros referentes à fisiologia normal da fêmea. Dentre esses parâmetros, deve ser ressaltado que, após um proestro e estro onde houve crescimento endometrial, é necessário um período de involução histológica do útero, antes de uma nova indução, sendo que esse período dura em média 135 dias (ANDERSON e SIMPSON, 1973). Os protocolos de indução iniciados antes desse período podem resultar em ciclos estrais com baixa fertilidade (KUTZLER, 2007).

Embora a transição do anestro para o proestro seja pouco conhecida (SPATTINI et al. 2007), tem sido observado um aumento na concentração e na pulsatilidade de LH antes do proestro (CONCANNON, 1998), acompanhado de um aumento da concentração circulante de FSH, que, de acordo com Oclin et al. (2001) e com Gier et al. (2006), esse parece ser o principal evento responsável pelo início da foliculogênese na cadela. Apesar disso, quando doses de LH foram administradas em cadelas no anestro, houve a indução de um crescimento folicular, o que resultou em novo proestro (CONCANNON, 1993).

Spattini et al. (2007) desenvolveram um estudo para avaliar a concentração plasmática de LH e prolactina durante a transição do anestro para o proestro e descreveram que a concentração média de LH aumentou pouco antes do início do proestro induzido. Ainda que existam algumas

divergências entre os autores a respeito do responsável pelo início de um novo ciclo reprodutivo, sabe-se que, na cadela, tanto o LH quanto o FSH são foliculotrópicos e têm papel fundamental no início de um novo ciclo estral (CONCANNON, 1993^a).

Conforme o anestro progride, existe um aumento concomitante da amplitude e do número dos pulsos de GnRH provenientes do hipotálamo (TANI, et al. 1996). Além disso, a hipófise anterior encontra-se mais sensível à ação do GnRH e, como consequência, existe um aumento da síntese e liberação de FSH e LH (VAN HAAFTEN et al. 1994).

Durante essa fase, foram observados também receptores da dopamina nos ovários e na hipófise. Com a presença desses receptores, a administração de um agonista da dopamina consegue ligar-se a eles e essa ligação promove estímulo para a liberação de FSH (KOOISTRA et al. 1999) e, possivelmente, também aumenta a sensibilidade ovariana em resposta à ação do FSH e LH (SPATTINI et al. 2007).

Segundo Spattini et al. (2007), por existirem receptores da dopamina tanto nos ovários quanto na hipófise, não se sabe ao certo se os efeitos dos agonistas da dopamina ocorrem na hipófise, nos ovários ou em ambos.

Nos tratamentos de indução do estro realizados durante o anestro, acredita-se que a prolactina tenha uma ação anti-gonadotrófica, sendo capaz de inibir a síntese de FSH e LH. Baseado nisso, quando a concentração de prolactina é baixa, existe um estímulo do eixo hipotálamo-hipófise, o que promove a indução de um novo ciclo. Esses tratamentos são mais eficazes em cadelas com anestros longos (OKKENS et al., 1997^a).

Em um estudo com 28 cadelas que apresentavam um anestro prolongado, foi utilizado um protocolo de indução do estro à base de cabergolina, na dose de 5µg/Kg/ uma vez ao dia por via oral. As fêmeas apresentaram sinais de proestro/estro cerca de cinco a 18 dias após o tratamento, sendo que todas as cadelas ficaram gestantes, indicando a indução de um estro fértil (ARBEITER e BARSCH, 1988).

Outro trabalho também com administração de cabergolina, realizado 30 dias após a onda pré-ovulatória de LH, portanto, na fase de diestro, foi observada uma diminuição no intervalo interestral, passando de 216

dias para aproximadamente 66 dias, porém, nem todas as fêmeas tratadas ficaram prenhes (JEUKENNE e VERSTEGEN, 1997).

Esses estudos revelam que a indução do estro pode ser realizada durante o diestro ou anestro. Todavia, quando a indução é feita no diestro, falhas ovulatórias podem ocorrer, pois é necessário um tempo para a ocorrência da regeneração endometrial (VERSTEGEN et al., 1999).

2.4.2. Prostaglandinas e análogos

As prostaglandinas são ácidos graxos insaturados e atingem o órgão-alvo por meio da corrente circulatória. Dentre as muitas funções das prostaglandinas, destaca-se a ação luteolítica, associada à fase luteínica do ciclo estral das fêmeas domésticas (HAFEZ, 2004).

Desta maneira, a ação pela qual a prostaglandina induz o estro é seu efeito de lise sobre o corpo lúteo, que nas cadelas estão presentes durante toda o diestro com duração de 63 (gestantes) a 100 dias (não gestantes) (JOHNSTON et al. 2001). Embora lise o corpo lúteo, o intervalo interestro pode não ser muito diminuído, já que os eventos que controlam o início do novo ciclo não são estimulados.

2.4.3. GnRH, agonistas e superagonistas do GnRH

O GnRH é um peptídeo sintetizado no hipotálamo e que tem ação na hipófise, onde se liga a receptores específicos. Essa ligação é a responsável pela estimulação da síntese das gonadotrofinas (LH e FSH), as quais agirão nas gônadas, regulando a síntese de hormônios esteróides, a espermatogênese, o desenvolvimento folicular e a ovulação (GOBELLO, 2006^b).

A indução do estro, por meio da administração de GnRH, ocorre devido à estimulação do eixo hipotálamo-hipófise. Além disso, essa administração deve ser feita na dose de 0,2-0,4µg/Kg a cada 70-90 minutos por mais de oito dias, mimetizando o que ocorre no ciclo espontâneo (HULL e KENIGSBURG, 1987).

De acordo com Concannon e Verstegen, (1997), o tratamento contínuo de GnRH (40-400ng/Kg) durante 90 minutos induz o proestro em três

a seis dias após o início do tratamento. Todavia, essa administração é clinicamente inviável, pois trata-se de um procedimento oneroso, com a necessidade de se utilizar um equipamento que faça a infusão do GnRH de maneira contínua e pulsátil o que na maioria das vezes, é inviável (CONCANNON, 1989).

Além dessa técnica de administração contínua de GnRH, existem outras, porém, que também apresentam efeitos colaterais indesejáveis, como falhas e diminuição da fase lútea com subsequente perda embrionária, diminuição da estimulação do hipotálamo, supressão da secreção de LH, redução da resposta do folículo ao LH e diminuição da secreção de progesterona (JACOBI e WENDEROTH, 1982), o que limitam o uso desse grupo de drogas. Ademais, quando utilizado o emprego de altas doses, 24-48µg/Kg, de um agonista do GnRH foi observado ser pouco eficaz na indução do estro, uma vez que foram evidenciadas falhas ou liberação insuficiente de LH (CONCANNON et al. 2006). Outro fator negativo quando se utiliza os agonistas do GnRH para induzir o estro, é que também foi observada luteólise prematura com subsequente perda gestacional.

2.4.4. Gonadotropinas

Durante o final do anestro, existe um aumento pulsátil na liberação de LH (CONCANNON, 1993^b). Tanto o LH quanto FSH são hormônios foliculotrópicos, capazes de induzir o estro, pois promovem o crescimento folicular. No entanto, os protocolos utilizados com gonadotrofinas não apresentam resultados satisfatórios (KUTZLER, 2005), sendo observadas reações alérgicas agudas após a administração endovenosa de 5mg de LH (BARDENS, 1971).

Os principais protocolos para a indução do estro por meio das gonadotropinas são baseados na combinação entre doses de FSH e LH (SHILLE et al. 1984), porém, de acordo com Bouchard et al. (1991), esses protocolos não apresentam muita eficácia em virtude da interferência dos produtos exógenos na liberação do LH endógeno.

A dose recomendada de LH para se induzir um novo ciclo reprodutivo é de 5-10mg/Kg (BARDENS, 1971).

2.4.5. Estrógeno

O mecanismo pelo qual o estrógeno controla o ciclo estral não é totalmente esclarecido. Por toda a fase lútea, existe uma pulsatilidade da secreção de estrógeno e durante o anestro essa pulsatilidade diminui. Entretanto, cerca de 30 dias antes do pico pré-ovulatório de LH, foi observado a existência de um novo aumento no padrão pulsátil de estrógeno, o qual é, aparentemente, o responsável pelo estímulo do eixo hipotálamo-hipófise e o início da pulsatilidade e liberação do LH (JEFFCOAT, 1993).

Ainda de acordo com Jeffcoat, (1993), não existe um consenso a respeito da concentração de estrógeno durante o anestro, já que alguns autores descrevem que o estrógeno sérico permanece baixo durante todo esse período (HADLEY, 1975), enquanto outros acreditam que a concentração, no anestro, é bastante variável (GRAF, 1978).

Em um estudo realizado por Hatoya et al. (2003), verificou-se um aumento de receptores de estrógeno no hipotálamo, na hipófise e nos ovários, no terço final do anestro. Essa afirmação levanta a hipótese de que o estrógeno possa estar envolvido na síntese e liberação dos pulsos de LH (KUTZLER, 2007). Além do mais, cadelas em anestro tratadas com 17- β estradiol apresentaram um aumento na concentração de GnRH (KUMAR, et al, 1980).

Os principais protocolos de indução do estro que utilizam estrógeno são, geralmente, associados a doses de FSH ou PMSG para a foliculogênese e LH ou hCG para a indução da ovulação (KUTZLER, 2007).

Bouchard et al. (1991), conseguiram induzir um estro fértil com o emprego do dietilestilbestrol (DES). No entanto, a indicação do estrógeno na indução do estro em cadela pode desencadear alguns efeitos colaterais, especialmente quando utilizados por mais de sete dias. Dentre os principais efeitos observados, estão: incontinência urinária, alopecia e supressão da medula óssea (DAVIS, 1984).

2.5. Principais protocolos utilizados na indução do estro na cadela

Na Tabela 1, estão descritos protocolos de indução do estro na fêmea canina, principalmente aqueles que obtiveram as maiores porcentagens de êxito.

TABELA 1: Principais protocolos utilizados na indução do estro na cadela, adaptado de JOHNSTON et al., 2001. Botucatu, 2009.

Protocolo	Proestro (%)	Ovulação (%)	Gestação (%)
PMSG 44UI/Kg/SID/IM/9 dias + hCG 500UI/IM	100%	84%	----
PMSG 44UI/Kg/SID/SC/9 dias + hCG 500UI/IM	60%	80%	----
PMSG 250UI/Kg/SC/20 dias ou até indução do proestro + hCG 500UI/SC	62,5%	40%	----
PMSG 500UI/Kg/IM/10 dias + hCG 500UI/IM	100%	----	20%
PMSG 500UI/Kg/IM/10 dias + GnRH 50µg	100%	----	----
hMG 75UI/SID/IM/9 dias	90%	67%	44%
LH 0,1UI/Kg/TID/7 dias	100%	----	31%
FSH 25-50UI/SC ou IM + estrógeno 0,1-0,5mg/SC ou IM	94%	----	----
DES 5mg/SID/VO/6-9 dias até a indução do proestro	100%	----	100%
GnRH 0.04-0,43µg/Kg/SC/90 em 90 minutos/6-12 dias	83%	80%	60%
GnRH 280-500ng/Kg/SC/90 em 90 minutos/7-9 dias	100%	80%	33%
GnRH 85-270ng/Kg/SC/90 em 90 minutos/7-9 dias	84%	42%	8%
Bromocriptina 20µg/Kg/BID/VO/21 dias	100%	----	83%
Bromocriptina 20µg/Kg/BID/VO/21 dias + PMSG 300UI/3 vezes em dias alternados	71%	57%	----
Bromocriptina 100µg/Kg/SID ou BID/VO/até a indução do proestro	100%	----	----
Bromocriptina 250µg/Kg/BID/VO/até a indução do proestro	100%	----	----
Cabergolina 5µg/Kg/SID/VO/7-10 dias	100%	----	93%
Cabergolina 5µg/Kg/SID/VO/até a indução do proestro	93%	----	86%

3. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo:

- Fazer uso da cabergolina durante a fase de anestro (105 a 120 dias), para a indução de um estro fértil em fêmeas com idade reprodutiva entre 2 a 6 anos, a fim de verificar a eficácia desse protocolo na diminuição do intervalo interestral, além de verificar possíveis efeitos colaterais;

- Identificar as fases de proestro e estro das fêmeas em estro espontâneo e estro induzido por meio dos sinais clínicos – edema de vulva e secreção vaginal – mudanças comportamentais, citologia vaginal e dosagem de progesterona;

- Comparar o perfil da progesterona e o padrão citológico entre as fêmeas dos dois grupos – estro espontâneo e estro induzido – a fim de verificar possíveis diferenças.

4. Material e métodos

O presente trabalho foi aprovado sem restrições pela Câmara de Ética em Experimentação Animal – CEEA – da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica – UNESP Campus de Botucatu. Essa aprovação é de fundamental importância, pois fiscaliza a execução e a ética dos experimentos, além de garantir o bem-estar dos animais envolvidos.

4.1. Animais

Foram utilizadas oito fêmeas da espécie canina, com idade entre dois a seis anos. Dos animais utilizados, cinco eram da raça Pastor Alemão, pertencentes ao Canil Germany Golden e três da raça Shih Tzu do Canil Letícia. Os canis se localizam na cidade de São José do Rio Preto, estado de São Paulo. Os proprietários dos referidos canis estavam cientes do protocolo experimental, concordaram com os procedimentos da pesquisa e autorizaram a utilização de seus cães neste estudo.

Os animais são alojados em sistema *outdoor* e expostos à luz natural; são alimentados com ração comercial duas vezes ao dia em quantidades ideais para manutenção do peso corpóreo e água disponível *ad libitum*.

Os animais foram inicialmente submetidos a um exame clínico completo, a fim de se verificar as condições de saúde dessas fêmeas. Após esses procedimentos as fêmeas foram divididas em dois grupos:

G1 – GRUPO CONTROLE OU ESTRO ESPONTÂNEO: constituído de cinco fêmeas na fase inicial do proestro, identificado por meio da observação de edema de vulva e secreção sanguinolenta.

G2 – GRUPO EXPERIMENTAL OU ESTRO INDUZIDO: constituído por cinco cadelas em anestro, identificado pelo histórico reprodutivo e comportamento. Após identificação da fase de anestro, esses animais receberam 5µg/Kg de cabergolina (Dostinex[®]), via oral, uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos. O início do protocolo hormonal foi realizado entre os dias 105 a 120 após o final do estro anterior, ou seja, no terço inicial do anestro (VERSTEGEN et al., 1999). Terminado o protocolo hormonal, os animais foram

observados diariamente, uma vez ao dia para identificação do início do proestro induzido.

Duas das oito fêmeas utilizadas no experimento foram incluídas nos dois grupos, ou seja, em duas cadelas foram avaliados o estro induzido e espontâneo.

Uma vez detectado o proestro, espontâneo ou induzido, os dois grupos foram submetidos às mesmas avaliações:

1. DURAÇÃO DAS FASES, FOLICULAR E LUTEAL: período entre o início da fase do proestro até o término da fase de estro, evidenciados pelo comportamento de rejeição e aceitação aos machos, secreção sanguinolenta, edema de vulva.

2. COMPORTAMENTO: duas vezes ao dia (manhã e tarde) as cadelas foram observadas para receptividade ao macho. As fêmeas foram colocadas próximas de dois machos para observação do comportamento de atração/aceitação e postura. As cadelas também foram pressionadas na região lombar e vulvar e observadas para modificações na postura como desvio de cauda, exposição de vulva e abertura dos membros posteriores.

3. SINAIS CLÍNICOS: foram observados, diariamente, edema de vulva, secreção vaginal.

4 . CITOLOGIA VAGINAL: após a identificação do início do proestro até o final da fase de aceitação do macho, esfregaços vaginais foram coletados a cada 48 horas. A coleta de material para a citologia vaginal foi realizada através de uma escova ginecológica, *citobrush* e as células foram transferidas para uma lâmina de vidro através de movimentos giratórios. Os esfregaços foram fixados em metanol e corados com a técnica de Panótico (¹Panótipo Rápido[®]), observados em microscópio de luz, com aumento de 400X para caracterizar a morfologia das células epiteliais. Para cada exame, 100 células

¹ Panótico Rápido – Laboratório LaborClin – Paraná – Brasil.

foram contadas e classificadas com base na morfologia em células parabasais, intermediárias, superficiais e escamas (JOHNSTON et al., 2001).

6. DOSAGEM DE PROGESTERONA SÉRICA: amostras de sangue foram coletadas através de venopunção da jugular em tubos sem anticoagulante. Foram retiradas amostras de 3,0 mL com seringas de 5,0 mL e agulhas 30x08. O sangue foi centrifugado (centrífuga Excelsa Baby – 206R – FANEM[®]) por 10 minutos, para obtenção do soro. A dosagem de progesterona foi determinada pela técnica do radioimunoensaio (RIA) em fase sólida, por meio do Kit comercial - Diagnostics Procedure Corporation – progeterone Coat – a – Count, Los Angeles, USA.

As amostras de sangue foram retiradas a cada dois dias, colhidas a partir do início da observação dos sinais característicos do proestro, ou seja, edema de vulva e secreção sanguinolenta até o início da fase de diestro citológico, determinado pelo comportamento de não aceitação e pelas características da citologia vaginal.

4.2. Estatística

Inicialmente, foi verificada a hipótese de existir diferenças referentes ao perfil de progesterona nos dois grupos estudados. Para testar essa hipótese foi realizada uma análise de variância, ignorando-se o fato de dois animais pertencerem a ambos os grupos – controle e experimental. Os valores da concentração de progesterona foram transformados em escala logarítmica e a análise de medidas repetidas² no tempo foi aplicada.

Foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney³, para verificar o dia em que o padrão citológico apresentou o maior número de células superficiais e/ou escamas, a fim de indicar semelhanças ou diferenças entre os grupos.

Ainda em relação à citologia vaginal, foi realizada uma análise da taxa de progressão das células superficiais, usando uma escala transformada

² (PROC MIXED do SAS) SAS Institute Inc., Statistical Analysis System, Cary, NC, USA. 2002-2003.

³ (Programa R) R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

[arcoseno de raiz (%/100)], até o valor máximo de células superficiais em função do tempo, por meio da análise de medidas repetidas ⁴.

⁴ (PROC MIXED do SAS) SAS Institute Inc., Statistical Analysis System, Cary, NC, USA. 2002-2003.

5. Resultados e discussão

A indução do estro na cadela é uma ferramenta importante no desenvolvimento do mercado *pet*, desde que sejam adotadas medidas criteriosas a respeito do emprego dos protocolos disponíveis para esse fim.

Ainda hoje, existem dificuldades quanto ao emprego de um protocolo de indução do estro que seja seguro e eficaz, principalmente pelo fato de alguns fármacos não serem aprovados para uso no Brasil. Além disso, as principais drogas disponíveis são consideradas caras pelos criadores, mas quando esse problema é analisado do ponto de vista custo/benefício, pode ser uma saída para resolução de alguns problemas vivenciados pelos criadores, como: possibilidade de melhora do manejo reprodutivo, disponibilidade de filhotes durante todo o ano e maior adaptação diante das exigências de mercado.

As recentes pesquisas realizadas com protocolos de indução do estro em cadela mostram que, embora o ciclo estral seja conhecido, os mecanismos responsáveis pelas transições das fases ainda não são completamente elucidados, especialmente os responsáveis pela transição do anestro para o proestro. Essa incógnita é uma das principais fontes de pesquisa, visto que a possibilidade de diminuição do intervalo interestral (IIE) poderia aumentar o número de gestações durante um ano e, dessa forma, gerar mais filhotes por uma mesma fêmea.

O IIE, cujo período corresponde ao final do estro e início do proestro do ciclo subsequente, foi analisado e comparado entre os dois grupos estudados: o grupo controle apresentou média de $169 \pm 13,43$ dias e o grupo experimental apresentou média de $159 \pm 15,01$ dias, não diferindo entre si ($p=0,37$) após análise de variância. A variação média do IIE descrita por Sokolowski (1977) é de 180 a 210 dias, podendo chegar a 300 dias, conforme aponta Jeffcoate (1993).

Apesar dos intervalos interestrais nos dois grupos não terem apresentado diferenças, quando analisamos esses resultados de forma prática, isso se constitui em um dado importante, visto que a diminuição do IIE pode ser alcançada e, portanto, ser uma ferramenta para criadores e profissionais no planejamento do manejo reprodutivo.

Certamente, para uma melhor padronização dos dados seria interessante acompanhar o estro espontâneo e induzido, nas mesmas fêmeas, a fim de verificar a existência ou não de diferença entre as duas condições. Nesse sentido, foi possível acompanhar duas fêmeas em estro espontâneo e induzido e os resultados mostraram que, após o protocolo de indução, o IIE foi reduzido em até 56 dias (Tabela 2). A análise individual desses resultados, para os criadores, é ainda mais relevante, já que possibilita melhorar e racionalizar o manejo reprodutivo dos canis, em virtude, principalmente, da possibilidade de controlar os cronogramas de acasalamento e nascimentos e, dessa maneira, atender a demanda de mercado.

As demais fêmeas do grupo experimental foram acompanhadas apenas durante o estro induzido e os dados referentes ao IIE, do estro anterior, foram obtidos por meio do histórico reprodutivo fornecido pelos criadores.

TABELA 2: Valores referentes aos intervalos interestrals (IIE) das 2 fêmeas acompanhadas em estro espontâneo e induzido. Botucatu, 2009.

Animal	Intervalo interestral estro espontâneo (dias)	Intervalo interestral estro induzido (dias)	Diferença do intervalo interestral (dias)
Bayla	168	112	56
Quena	156	117	39

A redução do IIE das duas fêmeas que foram acompanhadas durante os estros espontâneo e induzido foi superior à média obtida das demais fêmeas submetidas ao tratamento com cabergolina. No estro espontâneo, ambas as fêmeas (Bayla e Quena) não foram acasaladas e a indução do estro teve início 105 dias após o término do estro anterior, data considerada início de anestro por Verstegen et al., (1999).

Embora existam diferenças entre os autores e o presente trabalho em relação à duração do IIE ($169 \pm 13,43$ dias), sabe-se que esse intervalo é influenciado pela duração do anestro e esse, por sua vez, varia na dependência tanto da raça quanto da individualidade (OKKENS e KOOISTRA, 2006). Ademais, conforme a fêmea se torna mais velha, o anestro apresenta

maior variação (FELDMAN e NELSON, 2004) e, conseqüentemente, o IIE também.

Quando o protocolo para a indução do estro foi realizado, os resultados apontaram uma diminuição do IIE em todas as cinco fêmeas submetidas ao tratamento (Tabela 3). No entanto, a resposta ao tratamento, isto é, o período entre o início da administração da cabergolina e o início dos primeiros sinais de proestro, variou entre os animais e esses resultados podem ser observados na Tabela 4.

O início do tratamento para a indução do proestro foi realizado entre 105 a 120 dias após o final do estro, ou seja, durante a fase do anestro e o IIE médio foi de $159 \pm 44,5$ dias. Em um estudo realizado por Verstegen et al. (1998), a indução do estro realizada em diferentes fases do anestro, início (93 a 108), meio (123 a 156) e final (161 a 192), apontaram IIE, nos 3 grupos, de 131 ± 5 , 166 ± 7 e 196 ± 2 dias, respectivamente.

Em outro trabalho, realizado por Spattini et al. (2007), foi empregada a cabergolina ($5\mu\text{g}/\text{Kg}$) em 2 raças diferentes – Beagles e Greyhounds – para a indução do proestro. O início do tratamento ocorreu em torno de 95 dias após o final do estro. Conforme os autores, o intervalo interestral foi de 132 ± 5 e 169 ± 7 dias, para as respectivas raças.

Em ambos os trabalhos citados, a cabergolina foi o hormônio utilizado, porém, o início e duração do tratamento variaram em comparação ao presente trabalho. Os nossos resultados foram semelhantes aos de Verstegen et al. (1998), quando realizados no meio do anestro e aos de Spattini et al. (2007), para a raça Greyhounds.

Todas as cinco fêmeas submetidas ao tratamento com cabergolina apresentaram sinais de estro e, portanto, foram acasaladas durante o estro induzido. Após o manejo de acasalamento, quatro das cinco fêmeas tornaram-se gestantes e pariram normalmente. Apenas uma (Quena) fêmea do grupo experimental não se tornou gestante. Entretanto, o manejo de acasalamento dessa fêmea foi diferente ao das demais, essa cadela foi transportada para a cidade de Nipoã (interior de São Paulo) para ser coberta. Provavelmente o protocolo de cobertura não foi adequado, o estresse da viagem, possibilidade de infertilidade do macho e ainda o estro induzido não fértil são prováveis causas desse diagnóstico negativo de gestação.

TABELA 3: Valores referentes aos intervalos interestrals (IIE) das fêmeas do grupo experimental tanto no estro espontâneo quanto no induzido e a diferença entre ambos Botucatu, 2009.

Animal	Intervalo interestral estro espontâneo (dias)	Intervalo interestral estro induzido (dias)	Diferença do intervalo interestral (dias)
Ilka	186	170	16
Bayla	168	112	56
Yngra	199	195	04
Stephanie	210	201	09
Quena	156	117	39
Média	183,8	159	24, 8

O intervalo médio entre o final do tratamento com a cabergolina e o início dos sinais clínicos de proestro foi de 42,6 dias. No presente trabalho, os resultados mostraram uma variação individual mesmo quando considerados animais da mesma raça.

Gunay et al. (2004), desenvolveram um trabalho em que foram utilizadas fêmeas em diferentes fases do anestro, início (108 a 124 dias) e final (160 a 187 dias). Nesse estudo, os autores fizeram uso da cabergolina (Galastop, Vetern, Milano) na dose de 6µg/Kg, via oral, por no máximo 14 dias. Os resultados obtidos mostraram que a duração média da resposta ao tratamento foi de $11,3 \pm 2,8$ dias para as fêmeas do primeiro grupo e $6,6 \pm 0,8$ dias para os animais do segundo grupo. Provavelmente, a dose utilizada pelos autores mencionados foi responsável pela diferença dos resultados obtidos.

Cirit et al. (2006) utilizaram 0,6µg/Kg/dia de cabergolina em 27 animais e, desses, 22 apresentaram sinais de proestro entre quatro e 48 dias após o início do experimento. Esses resultados são semelhantes aos obtidos nessa pesquisa e abrem uma perspectiva de uma nova dosagem, quase dez vezes inferior a utilizada.

Os resultados referentes à resposta de ação da cabergolina descritos por Spattini et al., (2007), foram de $13,3 \pm 1,9$ em Beagles e $20,3 \pm$

1,7 em animais da raça Greyhounds. Uma possível explicação para as diferenças observadas é o período de duração do tratamento, já que, os autores acima realizaram a administração de cabergolina por até 4 semanas, enquanto, nesse trabalho, o tratamento foi por no máximo 15 dias.

TABELA 4: Valores referentes ao intervalo interestrual (IIE) das fêmeas do grupo experimental durante o estro induzido, a duração do tratamento da cabergolina e o intervalo entre o início do tratamento e os primeiros sinais de proestro. Botucatu, 2009.

Animal	Intervalo interestrual estro induzido (dias)	Duração do tratamento (dias)	Intervalo tratamento/proestro (dias)
Ilka	170	15	51
Bayla	112	04	04
Yngra	195	15	91
Stephanie	201	15	54
Quena	117	13	13
Média	159	12,4	42,6

As concentrações plasmáticas de progesterona apresentadas pelas cadelas dos grupos estudados foram semelhantes às obtidas por Gier et al. (2008), sendo possível observar em ambos os grupos o mesmo padrão de curva, em que durante quase todo proestro a concentração permanece em níveis basais e, somente no final do proestro e início do estro, as concentrações aumentam gradativamente. Na Tabela 5, pode-se visualizar as concentrações de progesterona em ambos os grupos analisados.

Quando a curva de progesterona das fêmeas do grupo experimental foi analisada e comparada com a curva do grupo controle, constatou-se que, embora apresentem o mesmo padrão, a concentração de progesterona no grupo experimental demora mais tempo para atingir os mesmos valores das fêmeas do grupo controle (Figura 1). Essa característica poderia indicar um retardamento das ovulações levando a concentrações menores de progesterona.

Contudo, mesmo que a concentração de progesterona do grupo controle tenha atingindo valores mais elevados no mesmo período em relação às fêmeas do grupo experimental, os resultados não apontaram diferenças entre os grupos ($p = -0,63$) quanto ao perfil de progesterona (Figura 2).

Para a análise do perfil da progesterona, apenas o efeito do tempo foi evidenciado ($p \leq 0,0001$) e verificou-se a necessidade de um número maior de animais para se obter mais informações a respeito do perfil hormonal, já que a variação de animal para animal é muito alta. Para a análise desse perfil, foram consideradas apenas quatro cadelas do grupo experimental; a fêmea Yngra não foi considerada, uma vez que não se dispunha de todas as dosagens hormonais. Duas fêmeas do grupo experimental apresentaram perfis semelhantes às fêmeas do grupo controle (Ilka e Quena) enquanto outras duas apresentaram perfis diferentes (Bayla e Stephanie). Tanto a Bayla quanto a Stephanie foram cobertas no estro induzido e tornaram-se prenhes, confirmando que mesmo existindo diferenças temporais entre os dois grupos, essas não foram suficientes para impedir a fertilidade do estro induzido.

TABELA 5: Concentrações médias de progesterona das fêmeas do grupo controle e do grupo experimental durante as coletas iniciadas a partir do primeiro dia do proestro até o final do estro, com intervalos de 48 horas. Botucatu, 2009.

Grupo controle progesterona (ng/mL)					Grupo experimental progesterona (ng/mL)				
Bayla	Anita	Maisha	Pietra	Quena	Ilka	Bayla	Yngra	Stephanie	Quena
0,14	0,48	----	0,55	0,23	0,63	0,05	----	0,64	0,10
0,19	0,50	0,27	0,36	0,27	0,91	0,09	----	1,43	0,30
1,36	0,63	0,56	1,66	0,47	1,09	0,13	----	0,04	0,43
2,36	0,95	2,71	2,84	3,97	4,25	0,12	----	0,18	1,46
8,68	1,91	6,48	7,19	7,34	10,65	0,15	1,33	0,16	2,70
15,01	3,46	10,66	23,42	19,38	27,48	1,01	2,93	0,46	10,82
25,74	16,08	----	32,90	35,13	29,93	1,80	8,10	1,57	22,38
24,85	36,24	26,32	37,70	37,34	29,62	6,73	12,78	4,51	26,23
----	----	----	----	----	----	13,57	18,67	13,31	----

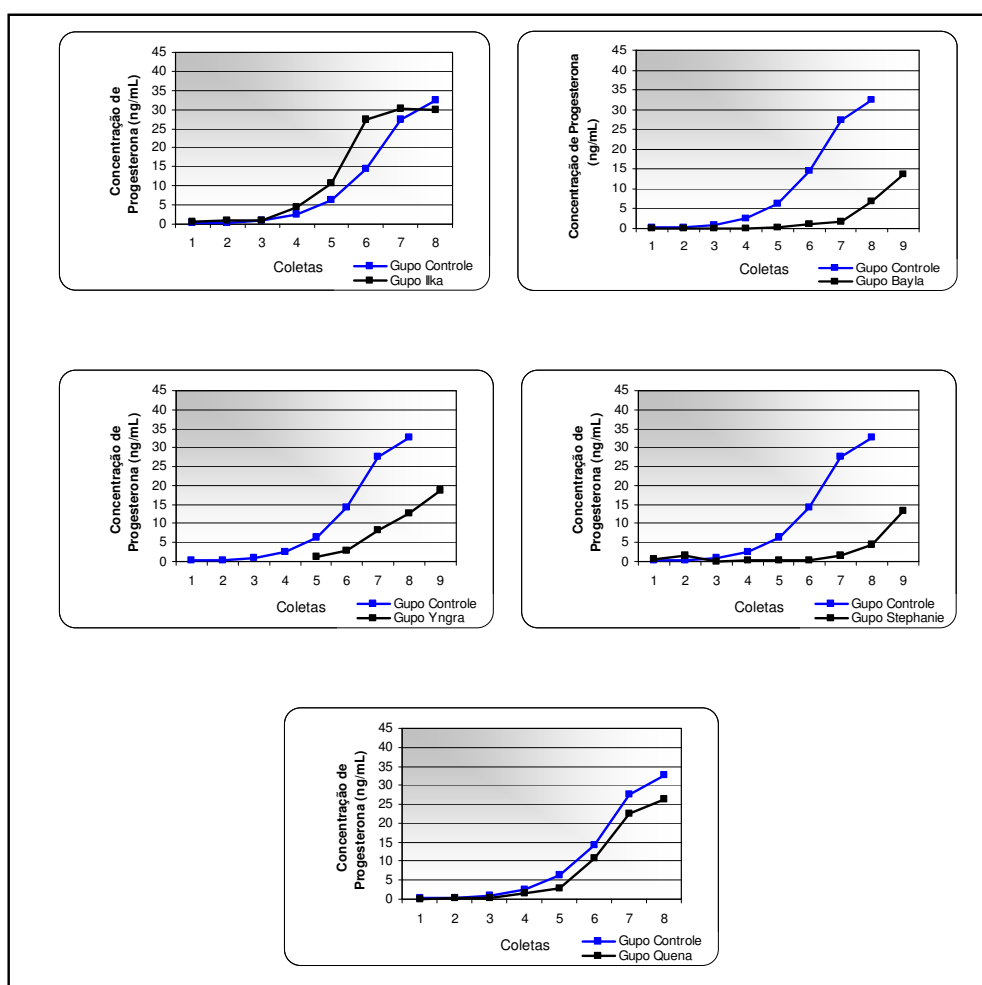


FIGURA 1: Concentrações plasmáticas médias de progesterona das fêmeas do grupo controle frente às concentrações individuais de progesterona das fêmeas do grupo experimental durante as fases de proestro e estro. Cada coleta corresponde a um intervalo de 48 horas. Botucatu, 2009.

Em relação às duas fêmeas pertencentes aos grupos controle e experimental, a curva da progesterona foi maior no estro espontâneo conforme mostra a Figura 3. Essa diferença, possivelmente, foi em virtude de um número maior de folículos ovulados no estro espontâneo, levando a um número maior de corpos lúteos sintetizando progesterona. Além disso, outra hipótese para explicar tal diferença nessa curva é a possibilidade das ovulações ocorrerem mais tardias no estro induzido em relação ao estro espontâneo e, dessa maneira, a formação dos corpos lúteos ocorreria também mais tardiamente e,

conseqüentemente, a elevação da progesterona levaria mais tempo para ocorrer.

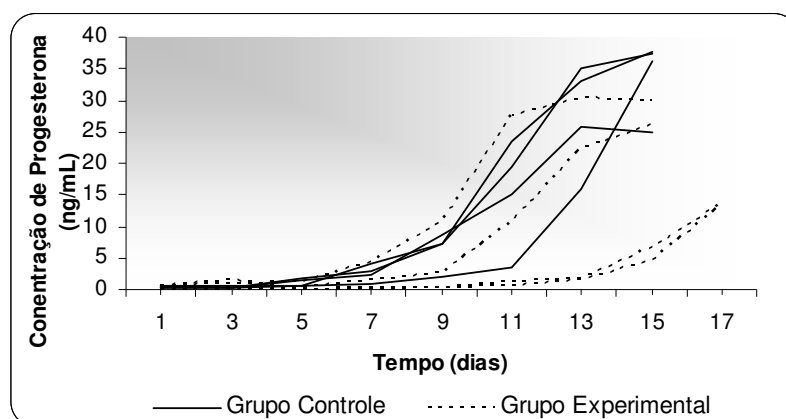


FIGURA 2: Perfil das concentrações plasmáticas de progesterona das fêmeas do grupo controle e do grupo experimental durante as fases de proestro e estro em relação ao tempo (dias) conforme o ciclo estral evolui. O aumento da concentração de progesterona torna-se mais evidente por volta do dia 7, período correspondente ao final do proestro início do estro. Botucatu, 2009.

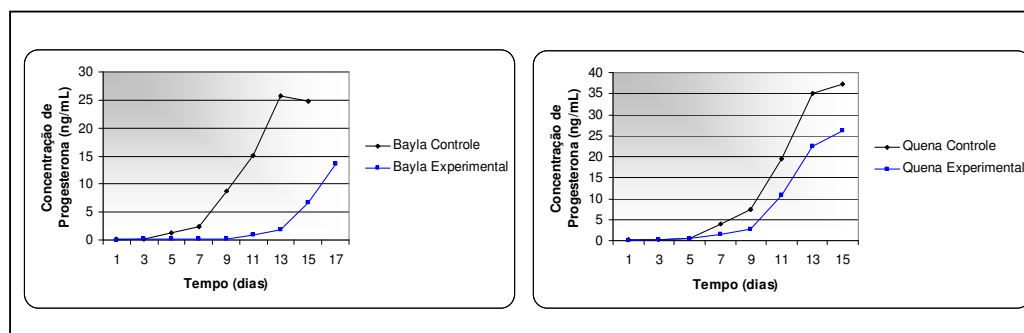


FIGURA 3: Perfil das concentrações plasmáticas de progesterona das 2 fêmeas acompanhadas durante o proestro e estro dos ciclos, espontâneo e induzido. Botucatu, 2009.

A citologia vaginal foi uma das ferramentas utilizadas no presente trabalho para o acompanhamento das fases do ciclo estral. Embora quando utilizada isoladamente não seja um critério fidedigno (JOHNSTON et al. 2001), os esfregaços vaginais associados a outros exames complementares foram utilizados para a detecção das fases do ciclo estral das fêmeas de ambos os grupos.

Os resultados referentes ao perfil citológico eram interpretados de acordo com Feldman e Nelson (2004), que consideram como estro citológico o momento em que o número de células superficiais e/ou escamas é igual ou superior a 80%. Na Figura 4, é possível observar a evolução do padrão citológico concomitantemente ao desenvolvimento do ciclo estral e fica clara a semelhança entre as duas condições.

Os resultados estatísticos dos exames citológicos apontaram uma similaridade entre os grupos, embora os resultados sugiram a existência de um possível retardamento do grupo experimental em relação ao controle quanto ao momento de surgimento da maior porcentagem de células superficiais em relação aos dias do ciclo estral ($p = -0,10$).

Esse resultado indica que os perfis de citologia nos grupos estudados são paralelos ($p = -0,77$) não sendo constatado efeito do grupo ($p = -0,34$). Em síntese, esses resultados apontam que ambos os grupos se comportam de maneira semelhante ao longo do tempo, havendo diferença significativa apenas relacionada ao tempo ($p = <0,0001$).

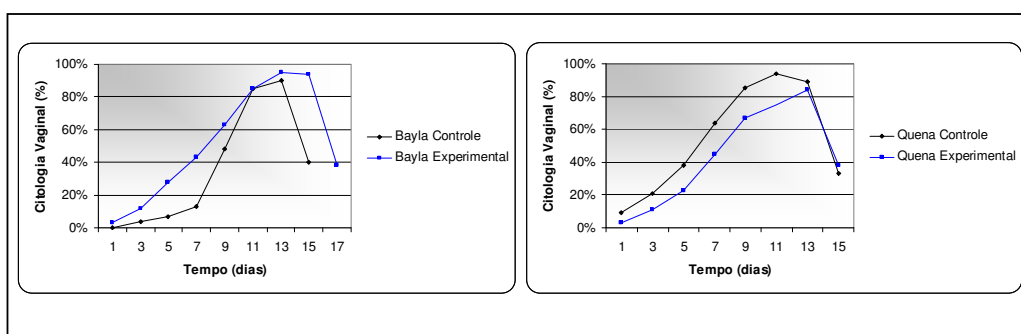


FIGURA 4: Padrão citológico das 2 fêmeas acompanhadas durante o proestro e estro espontâneo e induzido. Botucatu, 2009.

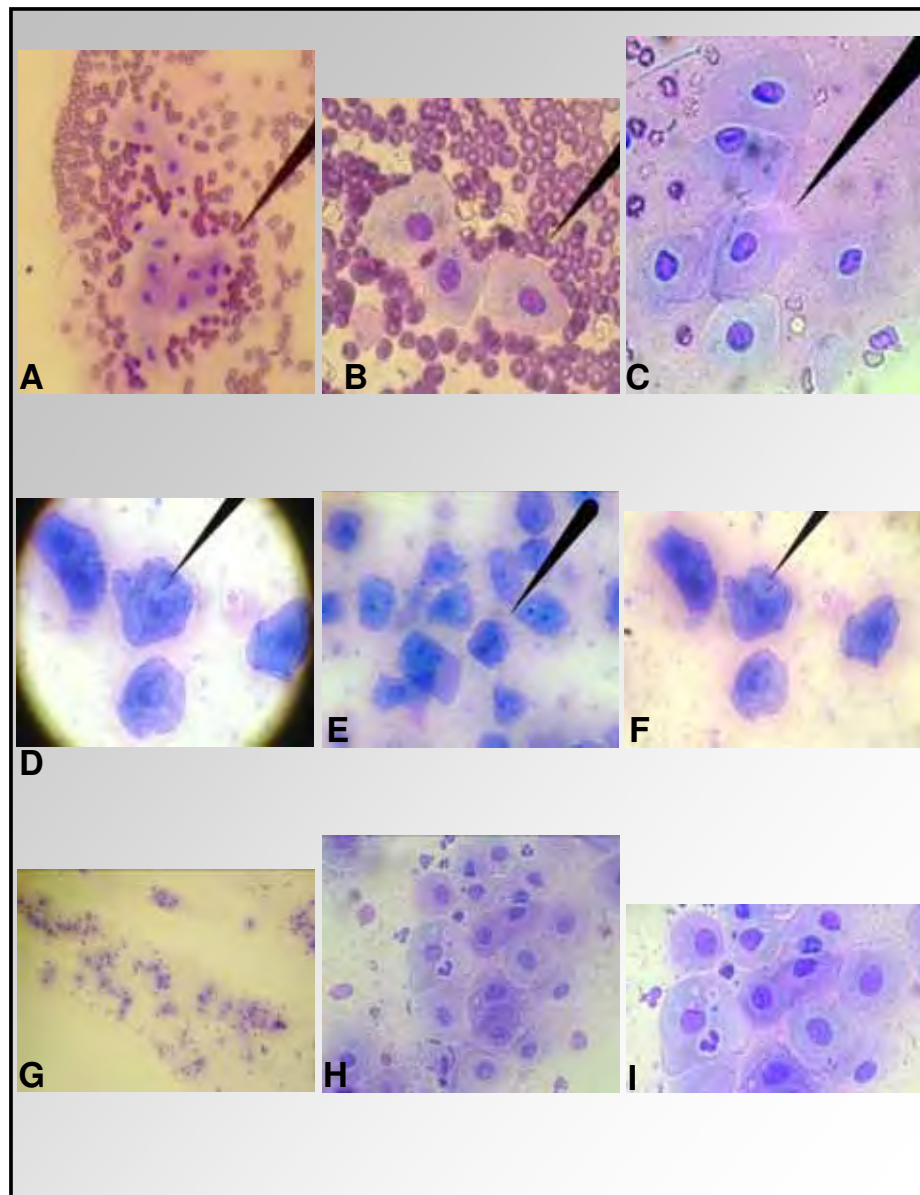


FIGURA 5: Microscopia óptica de esfregaço vaginal de fêmea do grupo controle durante as fases de proestro, estro e início de diestro. **A, B e C:** células parabasais, intermediárias pequenas e eritrócitos indicando proestro citológico; **D e E:** células intermediárias grandes (final do proestro citológico); **F:** células superficiais e escama (estro citológico); **G:** células intermediárias grandes e pequenas, neutrófilos; **H e I:** células intermediárias pequenas, células parabasais, neutrófilos, e células do metaestro (início de diestro citológico). Botucatu, 2009.

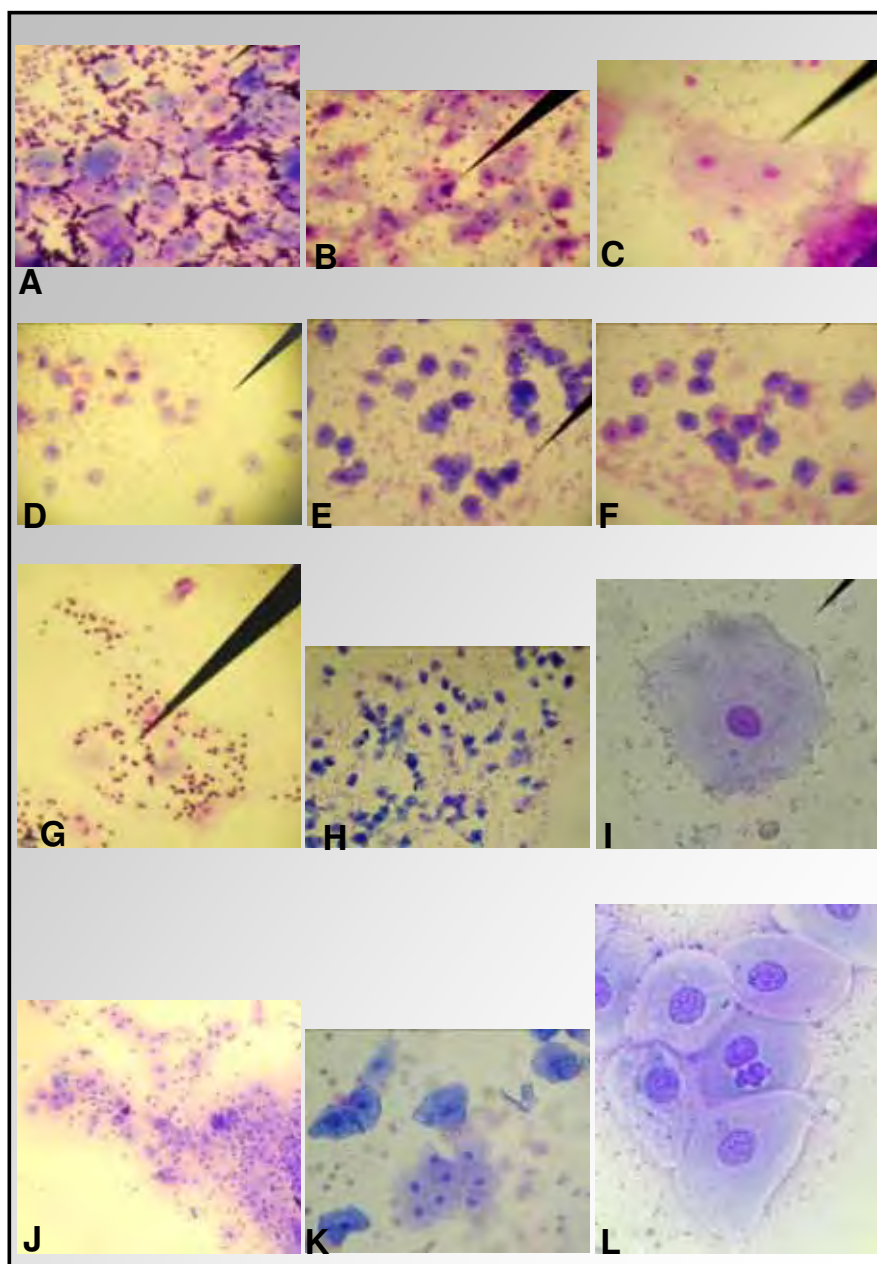


FIGURA 6: Microscopia óptica de esfregaço vaginal de fêmea do grupo experimental durante as fases de proestro, estro e início de diestro. **A, B e C:** células parabasais, intermediárias pequenas e eritrócitos indicando proestro citológico; **D, E e F:** células intermediárias pequenas e grandes e eritrócitos (meio do proestro citológico); **G:** células intermediárias grandes e células superficiais (final de proestro citológico); **H:** mais de 80% de células superficiais (estro citológico); **I:** célula superficial; **J e K:** células intermediárias pequenas e grandes, células parabasais, neutrófilos (início de diestro citológico); **L:** células intermediárias pequenas, células parabasais e célula do metaestro (diestro citológico). Botucatu, 2009.

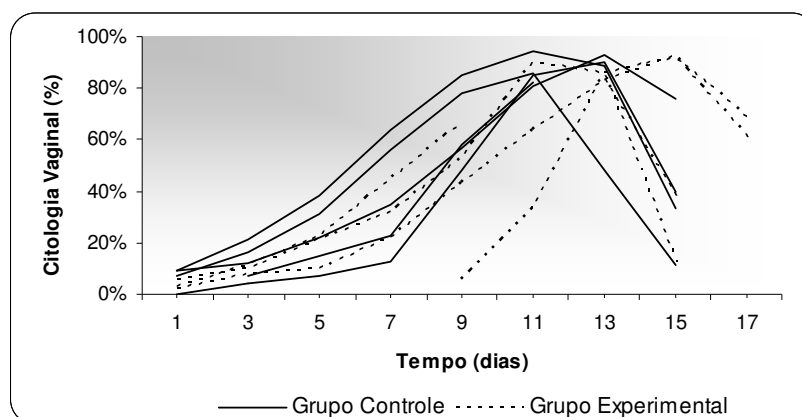


FIGURA 7: Perfil da citologia vaginal das fêmeas do grupo controle e do grupo experimental durante as fases de proestro e estro em relação ao tempo (dias) conforme o ciclo estral evolui. A curva da citologia aumenta durante o proestro onde existe a dominância do estrógeno. Após esse período, a concentração de progesterona aumenta inversamente proporcional ao padrão citológico. Botucatu, 2009.

Na análise de correlação entre as concentrações de progesterona com os demais parâmetros observados, edema vulvar e secreção vaginal, tanto para os animais do grupo controle quanto do grupo experimental. Os resultados mostraram uma correlação negativa entre o escore de progesterona e o edema de vulva para ambos os grupos $r=-0,62$, $p=0,0088$ (controle) e $r=-0,61$, $p=0,0055$ (experimental).

O edema de vulva observado durante o proestro e estro ocorre em virtude da vasodilatação e do aumento da permeabilidade capilar promovido pelo estrógeno (JOHNSTON et al., 2001). Portanto, o edema presente durante essas fases não mantém relação com a progesterona, o que explica a já esperada correlação negativa entre progesterona e edema de vulva (Figura 8).

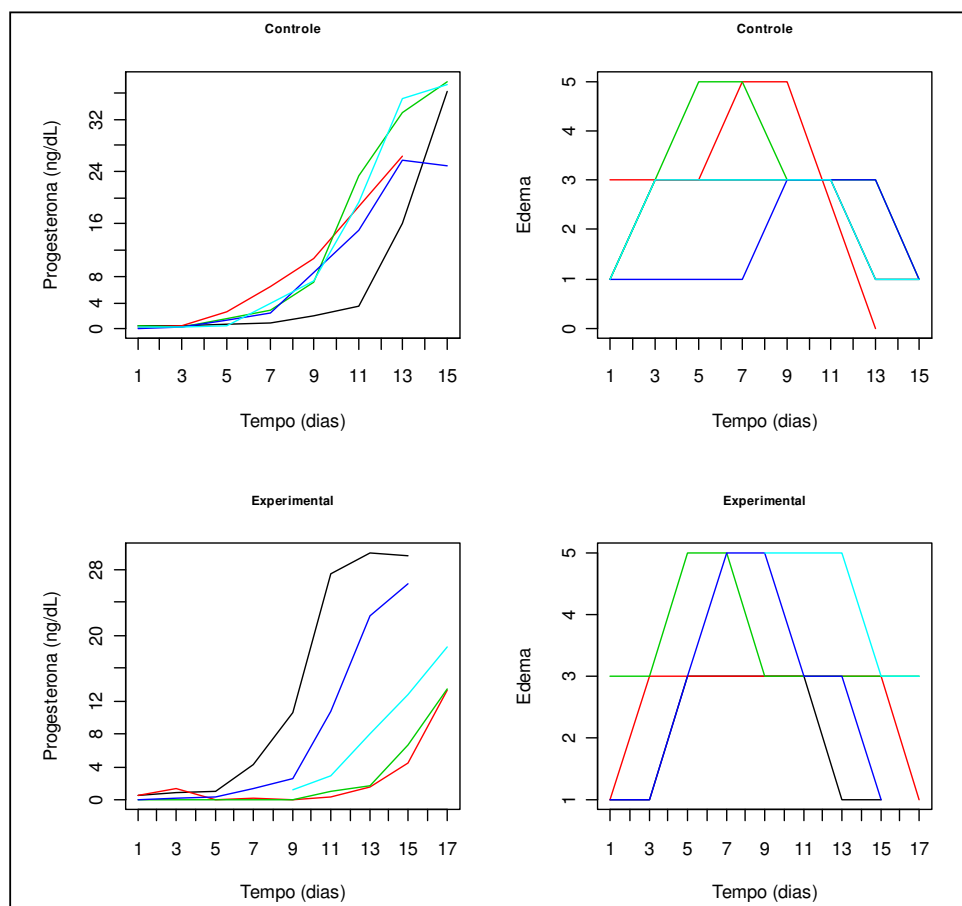


FIGURA 8: Gráficos para visualizar o perfil da progesterona e o escore para edema vaginal durante as fases de proestro e estro, separados por grupo. O escore do edema vaginal apresenta valores de 0 à 5 correspondentes à intensidade observada durante às coletas. Os valores foram separados da seguinte maneira: 0 (ausência -), 1 (leve +), 3 (moderado ++) e 5 (intenso +++). Botucatu, 2009.

Para a correlação entre o escore de progesterona e secreção vaginal, os resultados apontaram não existir correlação significativa para o grupo controle ($r=-0,26$, $p=0,35$); para o grupo experimental, a correlação foi de $r=-0,52$, $p=-0,52$ (Figura 9). Esse resultado era esperado, já que, assim como o edema de vulva, a secreção vaginal também apresenta correlação com o estrógeno e não com a progesterona. À medida que o estrógeno aumenta durante o proestro, o edema de vulva e a secreção vaginal também aumentam e, conforme a progesterona aumenta durante o final do proestro e estro, os sinais clínicos diminuem (FELDMAN e NELSON, 2004; LACROIX, 2004).

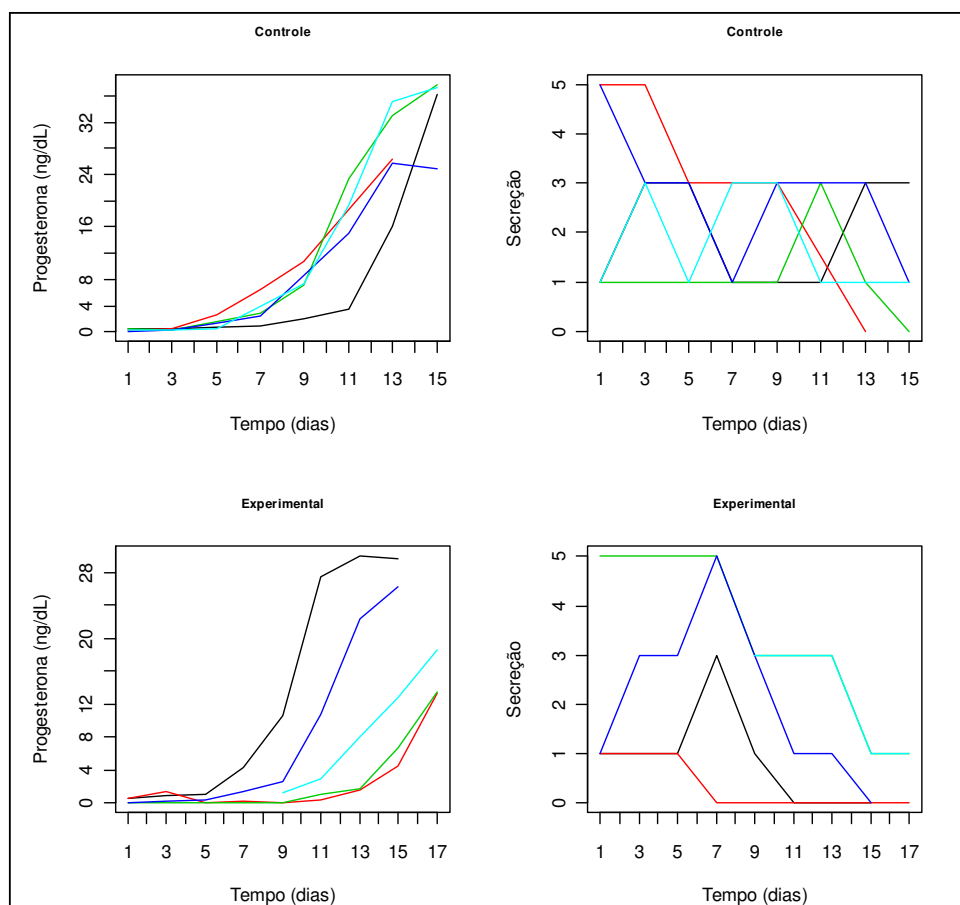


FIGURA 9: Gráficos para visualizar o perfil da progesterona e o escore da secreção vaginal durante as fases de proestro e estro, separados por grupo. O escore da secreção vaginal apresenta valores de 0 à 5 correspondentes à intensidade observada durante às coletas. Os valores foram separados da seguinte maneira: 0 (ausência -), 1 (leve +), 3 (moderado ++) e 5 (intenso +++). Botucatu, 2009.

Os resultados obtidos nesse trabalho foram interessantes e mostraram a eficácia da cabergolina na indução do estro em cadela, visto que em todas as cinco fêmeas submetidas ao tratamento, o estro pode ser observado e acompanhado. Além disso, o IIE pode ser diminuído em até 56 dias, o que pode representar uma melhor adaptação à demanda do mercado.

Embora o tratamento para a indução do estro em cadela ainda seja considerado oneroso, os resultados positivos podem melhorar e facilitar o manejo dos canis e, conseqüentemente, diminuir o custo de produção de filhotes. Além disso, alguns trabalhos estão sendo desenvolvidos para verificar

a eficácia do tratamento com cabergolina em baixas dosagens e, dessa maneira, diminuir custo desses tratamentos.

As pesquisas com foco na reprodução dos pequenos animais têm apresentado resultados favoráveis, o que contribui com os avanços biotecnológicos. Assim como nas demais espécies, o completo conhecimento do ciclo estral da espécie canina é fundamental antes de haver a implantação das biotecnologias e, para tal, são necessárias mais pesquisas, cujo enfoque seja a comparação entre o ciclo espontâneo e induzido, a fim de minimizar efeitos colaterais e maximizar os resultados.

6. Conclusões

- A cabergolina, quando administrada durante o início anestros, é capaz de induzir um estro fértil, uma vez que todas as cinco fêmeas submetidas ao tratamento de indução apresentaram sinais de estro e quatro fêmeas, após cobertura, tornaram-se gestantes e pariram normalmente;

- O IIE foi menor em todas as cinco fêmeas tratadas com cabergolina em relação ao estro espontâneo, sendo observada uma diminuição de até 56 dias, ou seja, quase dois meses;

-O perfil da progesterona não apresentou diferenças entre os grupos estudados, assim como o padrão citológico. Entretanto, a curva de crescimento da progesterona, em duas das cinco fêmeas, levou mais dias para atingir os mesmos valores obtidos no estro espontâneo;

- Os animais tratados com a cabergolina não apresentaram nenhum efeito colateral, o que mostra a segurança desse fármaco para a indução do estro.

- O presente trabalho possibilitou o acompanhamento e observação do ciclo estral de fêmeas caninas e mostrou uma semelhança entre os estros espontâneo e induzido quanto aos sinais clínicos, às mudanças comportamentais, ao padrão citológico e à concentração de progesterona.

7. Referências

ANDERSEN, A.C.; SIMPSON, M.F. The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle). **Geron-X Press**. California: 1973.

ARBEITER, K.; BARSCH, E. Possibilities of oestrus induction in the bitch in than ergoline derivate. **J Vet Med**, v.35, p.111-117, 1988.

BARDENS, J.W. Hormonal therapy for ovarian and testicular dysfunction in the dog. **J Am Vet Med Assoc**, v.159, p.1405, 1971.

BEIJERINK, N.J., et al. Low doses of bromocriptine shorten the interestrus interval in the bitch without lowering plasma prolactina concentration. **Theriogenology**, v.60, p.1379-1386, 2003.

BEIJERINK, N.J.; et al. Serotonin antagonist-induced lowering of prolactin secretion does not affect the pattern of pulsatile secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the bitch. **Reproduction**, v.128, p.181-188, 2004.

BELL E.T.; CHRISTIE D.W. Duration of proestrus, oestrus and vulval bleeding in the beagle bitch. **Br J Vet**, cap.127:xxv-xxvii, 1971.

BOUCHARD, G.F., et al. Seasonality and variability of the interestrus interval in the bitch. **Theriogenology**, v.36, p.41-50, 1991.

BOUCHARD, G.F., et al. Estrus induction in the bitch using a combination diethylstilbesterol and FSH-P. **Theriogenology**, v.36, p.51-65, 1991.

CHRISTIANSEN, J.B. Reproduction in the dog and cat. London: 1984.

CIRIT, Ü. ,et al. The effects of a low dose of cabergoline on induction of estrus and pregnancy rates in anestrus bitches. **Animal Reproduction Science**, p.1-11, 2006.

CONCANNON P.W.; HANSEL W. Effects of estrogen and progesterone on plasma LH, sexual behavior, and pregnancy in beagle bitches. **Fed Proc**, cap. 34, p. 323, 1975.

CONCANNON P.W. Reproductive physiology and endocrine patterns of the bitch. **Curr Vet Ther Small Anim Pract**, cap.8, p.886-900, 1983.

CONCANNON P.W. Canine physiology of reproduction. In: BURK T.J. (Ed) Small animal reproduction and infertility, p. 23-77, Philadelphia: 1986.

CONCANNON, P.W. Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by Constant infusion of GnRH agonist. **J Reprod Fertil Suppl**, v.39, p.149, 1989.

CONCANNON, P.W. Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs. **J Reprod Fertil Suppl**, v.47, p.3-27, 1993^a.

CONCANNON, P.W. Use of DES, gonadotropins, GnRH, GnRH agonists and dopamine agonists for rapid induction of fertile estrus in dogs. In: Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology, p.196-200, Jacksonville, 1993^b.

CONCANNON, P.W.; VERSTEGEN, J. Estrus induction in dogs: use of gonadotropins, therapies and dopamine agonists. **Proc Ann Meet Soc Theriogenology Montreal**, v.7, p.245, 1997.

CONCANNON, P.W. Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist. **J Reprod Fertil Suppl**, v.39, p.149-160, 1998.

CONCANNON, P.W., et al. Effects of dose and duration of continuous GnRH-agonist treatment on induction of estrus in beagle dogs: competing and concurrent up-regulation and down-regulation of LH release. **Theriogenology**, v.66, p.1488-1496, 2006.

CUNNINGHAM J.G. Tratado de fisiologia veterinária. Ed. Guanabara Koogan, cap.36, p.368-376, Rio de Janeiro: 1999.

DAVIS, W.M. Hapten-induced, immune-mediated thrombocytopenia in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v.184, p. 976-977, 1984.

ENGLAND G.; CONCANNON P.W. Determination of the optimal breeding time in the bitch: Basic considerations. In: CONCANNON P.W.; et al. Recent Advances in Small Animal Reproduction, 2001.

FELDMAN E.C.; NELSON R.W. Canine and feline endocrinology and reproduction. Ed. W.B. Saunders Company, cap.17, p.785. Pennsylvania: 2004.

FIENI, F., et al. Physiologie de la prolactine, pharmacologie des antiprolactiniques et applications chez la chienne. **Prat Med Chir Anim Comp**, v.34, p.187-199, 1999.

GIER, J., et al. Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone and follicle stimulation hormone around the time of ovulation in the bitch. **Theriogenology**, v.66, p.1419-1422, 2006.

GIER, J., et al. Physiology of the Canine and Anoestrous and Methods for Manipulation of Its Length. **Reprod Dom Anim**, v.43 (Suppl. 2), p.157-164, 2008.

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

GOBELLO, C. New GnRH analogs in canine reproduction. **Anim Reprod Scie**, p.1-13, 2006^b.

- GRAF, K.F. Serum oestrogen, progesterone and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactation beagle dogs. **J Reprod Fertil**, v.52, p.9-4, 1978.
- GUNAY, A., et al. Cabergoline applications in early and late anoestrus periods on German Shepherd dogs. **Res Med Vet**, v.155, p.557-560.
- GÜNZEL-APEL, A.R., et al. Concentrations OF progesterone, prolactina and relaxin in the luteal phase and pregnancy in normal and short-cycling German Shepherd dogs. **Theriogenology**, 2006.
- HADLEY, J.C. Total unconjugated oestrogen and progesterone concentrations in peripheral blood during the oestrus cycle of the dogs. **J Reprod Fertil**, v.44, p.445-452, 1975.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Reprodução animal. Ed. Manole, 7ª edição, Barueri-São Paulo: 2004.
- HATOYA, S., et al. Expression of estrogen receptor α and β genes in the mediobasal hypothalamus, pituitary and ovary during the canine estrous cycle. **Neurosci Lett**, v.347, p.131-135, 2003.
- HULL, M.E.; KENIGSBURG, D.J. Gonadotropin releasing hormone: function and clinical use. **Lb Mangg**, v.25, p.51-58, 1987.
- JACOBI, G.H.; WENDEROTH, U.K. Gonadotropin-releasing hormone analogues for prostate câncer: untoward side effects of high-dose regimens acquire a therapeutical dimension. **Eur Urol**, v.8, p.34-198, 1982.
- JEFFCOAT, I.A. Endocrinology of anestrous bitches. **J Reprod Fertil Suppl**, v.47, p.69-76, 1993.
- JEUKENNE, P.; VERSTEGEN, J. Termination of diestrus and induction of oestrus in diestrous non-pregnant bitches by the prolactin antagonist cabergoline. **J Reprod Fertil**, v.51, p.59-66, 1997.
- JOHNSTON S.D., et al. Canine and feline theriogenology. Ed. W. B. Saunders Company, cap. 2, p. 16-31, 2001.
- KOOISTRA, H.S. Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in beagle bitches. **Biol Reprod**, v.60, p.65-71, 1999.
- KOOISTRA, H.S., et al. Bromocriptine-induced premature estrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle stimulating hormone in beagle bitches. **J Reprod Fertil**, v.117, p.387-393, 1999.
- KUMAR, M.S., et al. Distribution of luteinizing hormone releasing hormone in the canine hypothalamus: effect of castration and exogenous gonadal steroids. **Am Vet Res**, v.41, p.1304-1309, 1980.

KUTZLER, M.A. Induction and synchronization of estrus in dogs. **Theriogenology**, v.64, p.766-775, 2005.

KUTZLER, M.A. Estrus induction and synchronization in canids and felids. **Theriogenology**, v.68, p.354-374, 2007.

LACROIX, C.F.E. Endocrinología y fisiopatología de la hembra canina. In: Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos, cap.17, p.175-190, 2004.

LUZ, M.R. Manejo DEL apareamiento en la especie canina. In: Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos, cap.10, p.99-106, 2004.

NOTHLING, J.O., et al. Abortefacient and endocrine effects of metergoline in beagle bitches during the second half of gestation. **Theriogenology**, v.59, p.1929-1240, 2003.

OKKENS, A.C., et al. Evidence for prolactina as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. **Veterinary Quarterly**, v.12, p.193-203, 1990.

OKKENS, A.C., et al. Dopamine agonistic effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the influencing factor on duration of anoestrus in bitches. **J Reprod Fertil Suppl**, v.51, p.55-58, 1997^a.

OKKENS, A.C., et al. Plasma concentrations of prolactin in overtly pseudopregnant Afghan hounds and the effect of metergoline. **J Reprod Fertil Suppl**, v.51, p.295-301, 1997^b.

OKKENS, A.C.; KOOISTRA, H.S. Anoestrus in the dog: a fascinating story. **Reprod Dom Anim**, p.291-296, 2006.

OLSON, P.N., et al. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. **Biol Reprod**, v.27, p.1196-1206, 1982.

ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J.P. Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous bigle bitches. **J Reprod Fertil Suppl**, 51, v.8, p.203, 1997.

ONCLIN, K., et al. FSH secretion patterns during pregnant and nonpregnant luteal periods and 24h secretion patterns in male and female dogs. **J Reprd Fertil Suppl**, v.57, p.15-21, 2001.

RAIN, C.P., et al. Cabergoline. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of hyperprolactinemia and inhibition of lactation. **Drugs**, v.49, p.255-279, 1995.

RAYMER J., et al. Chemical scent constituents in urine of wolf and their dependence on reproductive hormones. **J Chem Ecol**, cap. 12, p. 297-314, 1986.

ROMAGNOLI, S., et al. Clinical use of prostaglandin F2alpha to induce early abortion in bitches: serum progesterone, treatment outcome and interval to subsequent oestrus. **J Reprod Fertil Suppl**, 47, v.31, p. 425, 1993.

SHILLE, V.M., et al. Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropinas. **J Am Vet Med Assoc**, v.184, p.1469-1473, 1984.

SOKOLOWSKI, J.H. Reproductive patterns in the bitch. **Vet Clin North Am**, v.7, p.653-666, 1977.

SPATTINI, G., et al. Follicular development and plasma concentrations of LH and prolactina in anestrus female dogs treated with the dopamine agonist cabergolina. **Theriogenology**, v.68, p.826-833, 2007.

TANI, H., et al. Increasing gonadotropin-releasing hormone release by perfused hypothalamus from early to late anestrus in the beagle bitch. **Neurosci Lett**, v.207, p.1-4, 1996.

VAN HAAFTEN, B., et al. Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch. **J Reprod Fertil**, v.101, p.221-225, 1994.

VERSTEGEN, J.P.L., et al. Use of ultra-pure porcine LH to induce follicular growth, estrus and pregnancy in the bitch. **Biol Reprod Suppl**, 1, v.48, p.127, 1993.

VERSTEGEN, J., et al. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonista cabergoline in dogs. **Theriogenology**, v.51, p.597-611, 1999.

WILDT, D.E., et al. Relationship of serum estrone, estradiol-17 β and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. **Biol Reprod**, v.20, p.648-658, 1979.

WILDT, D.E., et al. Behavioral, ovarian and endocrine relationships in the pubertal bitch. **J Anim Sci**, v.53, p.182-191, 1981.

Trabalho a ser enviado à “Revista Ciência Animal Brasileira”**Título**

Indução do estro em cadela por meio da administração de um agonista da dopamina (cabergolina) durante o anestro

Título em Inglês

Oestrus induction in the bitch by the administration of a agonist of the dopamine (cabergoline) during the anoestrus

Nome dos Autores (por extenso)

Moisés Calvo de Paula¹ – Mestrando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Universidade Estadual Paulista – UNESP, CEP 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil – e-mail: moisescalvo@hotmail.com

Luis Carlos Oña Magalhães² – Mestrando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Universidade Estadual Paulista – UNESP, CEP 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil – e-mail: luismagalhaesona@gmail.com

Luzia Aparecida Trinca³ – Professora Adjunta do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, CEP 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil – e-mail: ltrinca@ibb.unesp.br

Eunice Oba⁴ – Professora Titular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, CEP 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil – e-mail: euniceoba@fmvz.unesp.br

Maria Denise Lopes⁵ – Professora Adjunta do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, CEP 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil – e-mail: denise@fmvz.unesp.br

Resumo

A cadela apresenta particularidades no ciclo estral e conhecê-las é fundamental para a implantação de biotécnicas reprodutivas. A indução do estro é uma importante ferramenta em pesquisas e no manejo reprodutivo de canis. O presente trabalho utilizou a cabergolina durante o anestro ($5\mu\text{g}/\text{Kg}$ por 15 dias ou até a fêmea apresentar sinais de estro), a fim de induzir e acompanhar as fases de proestro e estro em ambos grupos. As fêmeas foram divididas em: grupo controle ($n=5$) e grupo experimental ($n=5$). O acompanhamento das fases foram realizados por meio de: dosagem de progesterona, esfregaço vaginal, sinais clínicos e comportamento. As 5 fêmeas do grupo experimental responderam ao tratamento, após 42,6 dias, em média, e em 2 fêmeas essa resposta foi mais rápida apresentando sinais de estro antes do final do tratamento. O Intervalo Interestral (IIE) foi menor nas fêmeas do grupo experimental, 159 ± 15.01 , em relação às do grupo controle, 169 ± 13.43 . O perfil da progesterona e o padrão citológico não apresentaram diferenças entre os grupos, bem como os sinais clínicos e comportamentais. Em suma, a cabergolina pode ser empregada como agente indutor do estro na cadela, diminuindo o IIE e facilitando o manejo reprodutivo.

Palavras-chave: indução do estro, cabergolina, cadela.

Abstract

The bitch presents peculiarities estrus cycle that makes the knowing of such differences a sine qua non condition to the ones that want to implement assisted reproduction techniques. The estrus induction is an important tool in research and reproductive managements. Hence this present study has used the cabergoline during anoestrus ($5\mu\text{g}/\text{Kg}$ for 15 days or until the bitch presented estrus signs). Bitches were divided in: control group ($n=5$) and experimental group ($n=5$). Blood samples to check progesterone levels and vaginal smears, and clinical signs and behavioral changes were also observed and taken into consideration. All 5 females from the experimental group responded to the treatment (42,6 days), but 2 bitches responded earlier than that and both presented estrus signs before the end of the treatment. The interestrus interval (IEI) was shorter for the bitches in the experimental group, $159 \pm 15,01$, if compared to the control group, $169 \pm 13,43$ days. The progesterone profile and the cytological standard did not present any difference, and so happened to the clinical and behavioral signs. To

sum up, cabergoline can be used as a tool to induce estrus in bitches in order to reduce the IEI and facilitate the reproductive management.

Keywords: estrus induction, cabergoline, bitch.

Introdução

Os animais domésticos, como a cadela, apresentam períodos limitados de receptividade sexual. Essa limitação classifica-os como animais de ciclo estral. Por outro lado, os animais que são receptivos durante a maior parte do ciclo reprodutivo são classificados como animais de ciclo menstrual, incluindo os primatas e os seres humanos (CUNNINGHAM, 1999).

O entendimento do ciclo reprodutivo e de suas particularidades torna-se fundamental na implantação de qualquer técnica de reprodução assistida. Portanto, conhecer o histórico reprodutivo das fêmeas e entender o mecanismo responsável por cada fase, bem como suas transições, facilitam no momento de se adotar procedimentos que visem à maximização do desempenho reprodutivo.

A indução do estro é uma das técnicas utilizadas na maximização da eficiência reprodutiva das fêmeas domésticas e, ano após ano, vem sendo cada vez mais solicitada, principalmente por criadores. A indução do estro nas cadelas pode ser realizada por meio de medicamentos que estimulem o eixo hipotálamo-hipófise, os ovários ou ainda por grupos farmacológicos que inibam a prolactina (CONCANNON, 1993). Além disso, existe o aspecto social envolvido na indução do estro em cadela, observado quando fêmeas em estro induzem a ciclicidade ovariana de outras cadelas (CONCANNON, 1986). Tem-se estudado também o efeito do fotoperíodo na indução de um novo ciclo folicular na cadela, porém, existem poucas evidências que confirmem essa teoria (CONCANNON, 1993).

A técnica de indução do estro nas cadelas tem como indicações principais: tratamento do anestro primário e secundário; diminuição do intervalo interestrual, a fim de se aumentar o número de filhotes nascidos em um ano, atendendo melhor a exigência do mercado; indução de um novo ciclo quando uma cobertura anterior não foi possível ou perdida, seja por indisponibilidade de um macho ou por um estro silencioso; facilitar o manejo reprodutivo e possibilitar a implantação de técnicas de reprodução assistida, tanto para o cão doméstico como para os carnívoros silvestres, principalmente aqueles

em extinção e o tratamento da piometra quando realizado clinicamente (JOHNSTON, et al., 2001).

Os protocolos de indução do estro nessa espécie, embora eficazes, ainda não estão completamente elucidados quanto aos mecanismos responsáveis pelo início de uma nova fase folicular, uma vez que o evento responsável pela transição do anestro para o proestro não é totalmente conhecido (CONCANNON e VERSTEGEN, 1997). Além disso, muitos fármacos não são aprovados para o uso em pequenos animais, dificultando, assim, o emprego de alguns protocolos.

Material e Métodos

O presente trabalho foi aprovado sem restrições pela Câmara de Ética em Experimentação Animal – CEEA – da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica - Unesp campus de Botucatu. Essa aprovação é de fundamental importância, pois fiscaliza a execução e a ética dos experimentos, além de garantir o bem estar dos animais envolvidos.

Animais

Foram utilizadas oito fêmeas da espécie canina, com idade entre dois a seis anos. Dos animais utilizados, cinco eram da raça Pastor Alemão.

Os animais são alojados em sistema *outdoor* e expostos à luz natural; são alimentados com ração comercial duas vezes ao dia em quantidades ideais para manutenção do peso corpóreo e água disponível *ad libitum*.

Os animais foram inicialmente submetidos a um exame clínico completo, a fim de se verificar as condições de saúde dessas fêmeas. Após esses procedimentos as fêmeas foram divididas em dois grupos:

G1 – GRUPO CONTROLE OU ESTRO ESPONTÂNEO: constituído de cinco fêmeas na fase inicial do proestro, identificado por meio da observação de edema de vulva, secreção sanguinolenta e citologia vaginal.

G2 – GRUPO EXPERIMENTAL OU ESTRO INDUZIDO: constituído por cinco cadelas em anestro, identificado pelo histórico reprodutivo, comportamento e citologia vaginal. Após identificação da fase de anestro, esses animais receberam 5µg/Kg de cabergolina (Dostinex[®]), via oral, uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos ou até apresentarem

sinais de proestro. O início do protocolo hormonal foi realizado entre os dias 105 a 120 após o final do estro anterior, ou seja, no terço inicial do anestro (VERSTEGEN et al., 1999). Terminado o protocolo hormonal, os animais foram observados diariamente, uma vez ao dia para identificação do início do proestro induzido.

Duas das oito fêmeas utilizadas no experimento foram incluídas nos dois grupos, ou seja, em duas cadelas foram avaliados o estro induzido e espontâneo.

Uma vez detectado o proestro, espontâneo ou induzido, ambos os grupos foram submetidos às mesmas avaliações:

1. DURAÇÃO DAS FASES, FOLICULAR E LUTEAL: período entre o início da fase do proestro até o término da fase de estro, evidenciados pelo comportamento de rejeição e aceitação aos machos, secreção sanguinolenta, edema de vulva.

2. COMPORTAMENTO: duas vezes ao dia (manhã e tarde) as cadelas foram observadas para receptividade ao macho. As fêmeas foram colocadas próximas de dois machos para observação do comportamento de atração/aceitação e postura. As cadelas também foram pressionadas na região lombar e vulvar e observadas para modificações na postura como desvio de cauda, exposição de vulva e abertura dos membros posteriores.

3. SINAIS CLÍNICOS: foram observados diariamente edema de vulva, secreção vaginal.

4 . CITOLOGIA VAGINAL: esfregaços vaginais foram coletados a cada 48 horas após a identificação do início do proestro até o final da fase de aceitação do macho. A coleta de material para a citologia vaginal foi realizada através de uma escova ginecológica, *citobrush* e as células foram transferidas para uma lâmina de vidro através de movimentos giratórios. Os esfregaços foram fixados em metanol e corados com a técnica de Panótico (⁵Panótipo Rápido[®]), observados em microscópio de luz, com aumento de 400X para caracterizar a morfologia das células epiteliais. Para cada exame, 100 células foram contadas e classificadas com base na morfologia em células parabasais, intermediárias, superficiais e escamas (JOHNSTON et al., 2001).

⁵Panótico Rápido – Laboratório LaborClin – Paraná – Brasil.

6. DOSAGEM DE PROGESTERONA SÉRICA: amostras de sangue foram coletadas através de venopunção da jugular em tubos sem anticoagulante. Foram retiradas amostras de 3,0 mL com seringas de 5,0 mL e agulhas 30x08. O sangue foi centrifugado (centrífuga Excelsa Baby – 206R – FANEM[®]) por 10 minutos, para obtenção do soro. A dosagem de progesterona foi determinada pela técnica do radioimunoensaio (RIA) em fase sólida, por meio do Kit comercial - Diagnostics Procedure Corporation – progeterone Coat – a – Count, Los Angeles, USA.

As amostras de sangue foram retiradas a cada dois dias, colhidas a partir do início da observação dos sinais característicos do proestro, ou seja, edema de vulva e secreção sanguinolenta até o início da fase de diestro citológico, determinado pelo comportamento de não aceitação e pelas características da citologia vaginal.

Estatística

Inicialmente, foi verificada a hipótese de existir diferenças referentes ao perfil de progesterona nos dois grupos estudados. Para testar essa hipótese foi realizada uma análise de variância, ignorando-se o fato de dois animais pertencerem a ambos os grupos – controle e experimental. Os valores da concentração de progesterona foram transformados em escala logarítmica e a análise de medidas repetidas⁶ no tempo foi aplicada.

Foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney⁷, para verificar o dia em que o padrão citológico apresentou o maior número de células superficiais e/ou escamas, a fim de indicar semelhanças ou diferenças entre os grupos.

Ainda em relação à citologia vaginal, foi realizada uma análise da taxa de progressão das células superficiais, usando uma escala transformada [arcoseno de raiz (%/100)], até o valor máximo de células superficiais em função do tempo, por meio da análise de medidas repetidas⁸.

⁶ (PROC MIXED do SAS) SAS Institute Inc., Statistical Analysis System, Cary, NC, USA. 2002-2003.

⁷ (Programa R) R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

⁸ (PROC MIXED do SAS) SAS Institute Inc., Statistical Analysis System, Cary, NC, USA. 2002-2003.

Resultados e Discussão

A indução do estro na cadela é uma ferramenta importante no desenvolvimento do mercado *pet*, desde que sejam adotadas medidas criteriosas a respeito do emprego dos protocolos disponíveis para esse fim.

Ainda hoje, existem dificuldades quanto ao emprego de um protocolo de indução do estro que seja seguro e eficaz, principalmente pelo fato de alguns fármacos não serem aprovados para uso no Brasil. Além disso, as principais drogas disponíveis são consideradas caras pelos criadores, mas quando esse problema é analisado do ponto de vista custo/benefício, pode ser uma saída para resolução de alguns problemas vivenciados pelos criadores, como: possibilidade de melhora do manejo reprodutivo, disponibilidade de filhotes durante todo o ano e maior adaptação diante das exigências de mercado.

As recentes pesquisas realizadas com protocolos de indução do estro em cadela mostram que, embora o ciclo estral seja conhecido, os mecanismos responsáveis pelas transições das fases ainda não são completamente elucidados, especialmente os responsáveis pela transição do anestro para o proestro. Essa incógnita é uma das principais fontes de pesquisa, visto que a possibilidade de diminuição do intervalo interestral (IIE) poderia aumentar o número de gestações durante um ano e, dessa forma, gerar mais filhotes por uma mesma fêmea.

O IIE, cujo período corresponde ao final do estro e início do proestro do ciclo subsequente, foi analisado e comparado entre os dois grupos estudados: o grupo controle apresentou média de $169 \pm 13,43$ dias e o grupo experimental apresentou média de $159 \pm 15,01$ dias, não diferindo entre si ($p= 0,37$) após análise de variância. A variação média do IIE descrita por Sokolowski (1977) é de 180 a 210 dias, podendo chegar a 300 dias, conforme aponta Jeffcoate (1993).

Apesar dos intervalos interestrals nos dois grupos não terem apresentado diferenças, quando analisamos esses resultados de forma prática, isso se constitui em um dado importante, visto que a diminuição do IIE pode ser alcançada e, portanto, ser uma ferramenta para criadores e profissionais no planejamento do manejo reprodutivo.

Certamente, para uma melhor padronização dos dados seria interessante acompanhar o estro espontâneo e induzido, nas mesmas fêmeas, a fim de verificar a existência ou não de diferença entre as duas condições. Nesse sentido, foi possível acompanhar duas fêmeas em estro espontâneo e induzido e os resultados mostraram que, após o protocolo

de indução, o IIE foi reduzido em até 56 dias (Tabela 1). A análise individual desses resultados, para os criadores, é ainda mais relevante, já que possibilita melhorar e racionalizar o manejo reprodutivo dos canis, em virtude, principalmente, da possibilidade de controlar os cronogramas de acasalamento e nascimentos e, dessa maneira, atender a demanda de mercado.

As demais fêmeas do grupo experimental foram acompanhadas apenas durante o estro induzido e os dados referentes ao IIE, do estro anterior, foram obtidos por meio do histórico reprodutivo fornecido pelos criadores.

TABELA 1: Valores referentes aos intervalos interestrals (IIE) das 2 fêmeas acompanhadas em estro espontâneo e induzido. Botucatu, 2009.

Animal	Intervalo interestral estro espontâneo (dias)	Intervalo interestral estro induzido (dias)	Diferença do intervalo interestral (dias)
Bayla	168	112	56
Quena	156	117	39

A redução do IIE das duas fêmeas que foram acompanhadas durante os estros espontâneo e induzido foi superior à média obtida das demais fêmeas submetidas ao tratamento com cabergolina. No estro espontâneo, ambas as fêmeas (Bayla e Quena) não foram acasaladas e a indução do estro teve início 105 dias após o término do estro anterior, data considerada início de anestro por Verstegen et al., (1999).

Embora existam diferenças entre os autores e o presente trabalho em relação à duração do IIE ($169 \pm 13,43$ dias), sabe-se que esse intervalo é influenciado pela duração do anestro e esse, por sua vez, varia na dependência tanto da raça quanto da individualidade (OKKENS e KOOISTRA, 2006). Ademais, conforme a fêmea se torna mais velha, o anestro apresenta maior variação (FELDMAN e NELSON, 2004) e, conseqüentemente, o IIE também.

Quando o protocolo para a indução do estro foi realizado, os resultados apontaram uma diminuição do IIE em todas as cinco fêmeas submetidas ao tratamento (Tabela 2). No entanto, a resposta ao tratamento, isto é, o período entre o início da administração da cabergolina e o início dos primeiros sinais de proestro, variou entre os animais e esses resultados podem ser observados na Tabela 3.

O início do tratamento para a indução do proestro foi realizado entre 105 a 120 dias após o final do estro, ou seja, durante a fase do anestro e o IIE médio foi de $159 \pm 44,5$ dias. Em um estudo realizado por Verstegen et al. (1998), a indução do estro realizada em diferentes fases do anestro, início (93 a 108), meio (123 a 156) e final (161 a 192), apontaram IIE, nos 3 grupos, de 131 ± 5 , 166 ± 7 e 196 ± 2 dias, respectivamente.

Em outro trabalho, realizado por Spattini et al. (2007), foi empregada a cabergolina ($5\mu\text{g}/\text{Kg}$) em 2 raças diferentes – Beagles e Greyhounds – para a indução do proestro. O início do tratamento ocorreu em torno de 95 dias após o final do estro. Conforme os autores, o intervalo interestral foi de 132 ± 5 e 169 ± 7 dias, para as respectivas raças.

Em ambos os trabalhos citados, a cabergolina foi o hormônio utilizado, porém, o início e duração do tratamento variaram em comparação ao presente trabalho. Os nossos resultados foram semelhantes aos de Verstegen et al. (1999), quando realizados no meio do anestro e aos de Spattini et al. (2007), para a raça Greyhounds.

Todas as cinco fêmeas submetidas ao tratamento com cabergolina apresentaram sinais de estro e, portanto, foram acasaladas durante o estro induzido. Após o manejo de acasalamento, quatro das cinco fêmeas tornaram-se gestantes e pariram normalmente. Apenas uma (Quena) fêmea do grupo experimental não se tornou gestante. Entretanto, o manejo de acasalamento dessa fêmea foi diferente ao das demais, essa cadela foi transportada para a cidade de Nipoã (interior de São Paulo) para ser coberta. Provavelmente o protocolo de cobertura não foi adequado, o estresse da viagem, possibilidade de infertilidade do macho e ainda o estro induzido não fértil são prováveis causas desse diagnóstico negativo de gestação.

TABELA 2: Valores referentes aos intervalos interestrals (IIE) das fêmeas do grupo experimental tanto no estro espontâneo quanto no induzido e a diferença entre ambos Botucatu, 2009.

Animal	Intervalo interestrals estro espontâneo (dias)	Intervalo interestrals estro induzido (dias)	Diferença do intervalo interestrals (dias)
Ilka	186	170	16
Bayla	168	112	56
Yngra	199	195	04
Stephanie	210	201	09
Quena	156	117	39
Média	183,8	159	24, 8

O intervalo médio entre o final do tratamento com a cabergolina e o início dos sinais clínicos de proestro foi de 42,6 dias. No presente trabalho, os resultados mostraram uma variação individual mesmo quando considerados animais da mesma raça.

Gunay et al. (2004), desenvolveram um trabalho em que foram utilizadas fêmeas em diferentes fases do anestro, início (108 a 124 dias) e final (160 a 187 dias). Nesse estudo, os autores fizeram uso da cabergolina (Galastop, Vetern, Milano) na dose de 6µg/Kg, via oral, por no máximo 14 dias. Os resultados obtidos mostraram que a duração média da resposta ao tratamento foi de $11,3 \pm 2,8$ dias para as fêmeas do primeiro grupo e $6,6 \pm 0,8$ dias para os animais do segundo grupo. Provavelmente, a dose utilizada pelos autores mencionados foi responsável pela diferença dos resultados obtidos.

Cirit et al. (2006) utilizaram 0,6µg/Kg/dia de cabergolina em 27 animais e, desses, 22 apresentaram sinais de proestro entre quatro e 48 dias após o início do experimento. Esses resultados são semelhantes aos obtidos nessa pesquisa e abrem uma perspectiva de uma nova dosagem, quase dez vezes inferior a utilizada.

Os resultados referentes à resposta de ação da cabergolina descritos por Spattini et al., (2007), foram de $13,3 \pm 1,9$ em Beagles e $20,3 \pm 1,7$ em animais da raça Greyhounds. Uma possível explicação para as diferenças observadas é o período de duração do

tratamento, já que, os autores acima realizaram a administração de cabergolina por até 4 semanas, enquanto, nesse trabalho, o tratamento foi por no máximo 15 dias.

TABELA 3: Valores referentes ao intervalo interestrual (IIE) das fêmeas do grupo experimental durante o estro induzido, a duração do tratamento da cabergolina e o intervalo entre o início do tratamento e os primeiros sinais de proestro. Botucatu, 2009.

Animal	Intervalo interestrual estro induzido (dias)	Duração do tratamento (dias)	Intervalo tratamento/proestro (dias)
Ilka	170	15	51
Bayla	112	04	04
Yngra	195	15	91
Stephanie	201	15	54
Quena	117	13	13
Média	159	12,4	42,6

As concentrações plasmáticas de progesterona apresentadas pelas cadelas dos grupos estudados foram semelhantes às obtidas por Gier et al. (2008), sendo possível observar em ambos os grupos o mesmo padrão de curva, em que durante quase todo proestro a concentração permanece em níveis basais e, somente no final do proestro e início do estro, as concentrações aumentam gradativamente. Na Tabela 4, pode-se visualizar as concentrações de progesterona em ambos os grupos analisados.

Quando a curva de progesterona das fêmeas do grupo experimental foi analisada e comparada com a curva do grupo controle, constatou-se que, embora apresentem o mesmo padrão, a concentração de progesterona no grupo experimental demora mais tempo para atingir os mesmos valores das fêmeas do grupo controle (Figura 1). Essa característica poderia indicar um retardamento das ovulações levando a concentrações menores de progesterona.

Contudo, mesmo que a concentração de progesterona do grupo controle tenha atingido valores mais elevados no mesmo período em relação às fêmeas do grupo experimental, os resultados não apontaram diferenças entre os grupos ($p = 0,63$) quanto ao perfil de progesterona (Figura 2).

Para a análise do perfil da progesterona, apenas o efeito do tempo foi evidenciado ($p \leq 0,0001$) e verificou-se a necessidade de um número maior de animais para se obter mais informações a respeito do perfil hormonal, já que a variação de animal para animal é muito alta. Para a análise desse perfil, foram consideradas apenas quatro cadelas do grupo experimental; a fêmea Yngra não foi considerada, uma vez que não se dispunha de todas as dosagens hormonais. Duas fêmeas do grupo experimental apresentaram perfis semelhantes às fêmeas do grupo controle (Ilka e Quena) enquanto outras duas apresentaram perfis diferentes (Bayla e Stephanie). Tanto a Bayla quanto a Stephanie foram cobertas no estro induzido e tornaram-se prenhes, confirmando que mesmo existindo diferenças temporais entre os dois grupos, essas não foram suficientes para impedir a fertilidade do estro induzido.

TABELA 5: Concentrações médias de progesterona das fêmeas do grupo controle e do grupo experimental durante as coletas iniciadas a partir do primeiro dia do proestro até o final do estro, com intervalos de 48 horas. Botucatu, 2009.

Grupo controle progesterona (ng/mL)					Grupo experimental progesterona (ng/mL)				
Bayla	Anita	Maisha	Pietra	Quena	Ilka	Bayla	Yngra	Stephanie	Quena
0,14	0,48	----	0,55	0,23	0,63	0,05	----	0,64	0,10
0,19	0,50	0,27	0,36	0,27	0,91	0,09	----	1,43	0,30
1,36	0,63	0,56	1,66	0,47	1,09	0,13	----	0,04	0,43
2,36	0,95	2,71	2,84	3,97	4,25	0,12	----	0,18	1,46
8,68	1,91	6,48	7,19	7,34	10,65	0,15	1,33	0,16	2,70
15,01	3,46	10,66	23,42	19,38	27,48	1,01	2,93	0,46	10,82
25,74	16,08	----	32,90	35,13	29,93	1,80	8,10	1,57	22,38
24,85	36,24	26,32	37,70	37,34	29,62	6,73	12,78	4,51	26,23
----	----	----	----	----	----	13,57	18,67	13,31	----

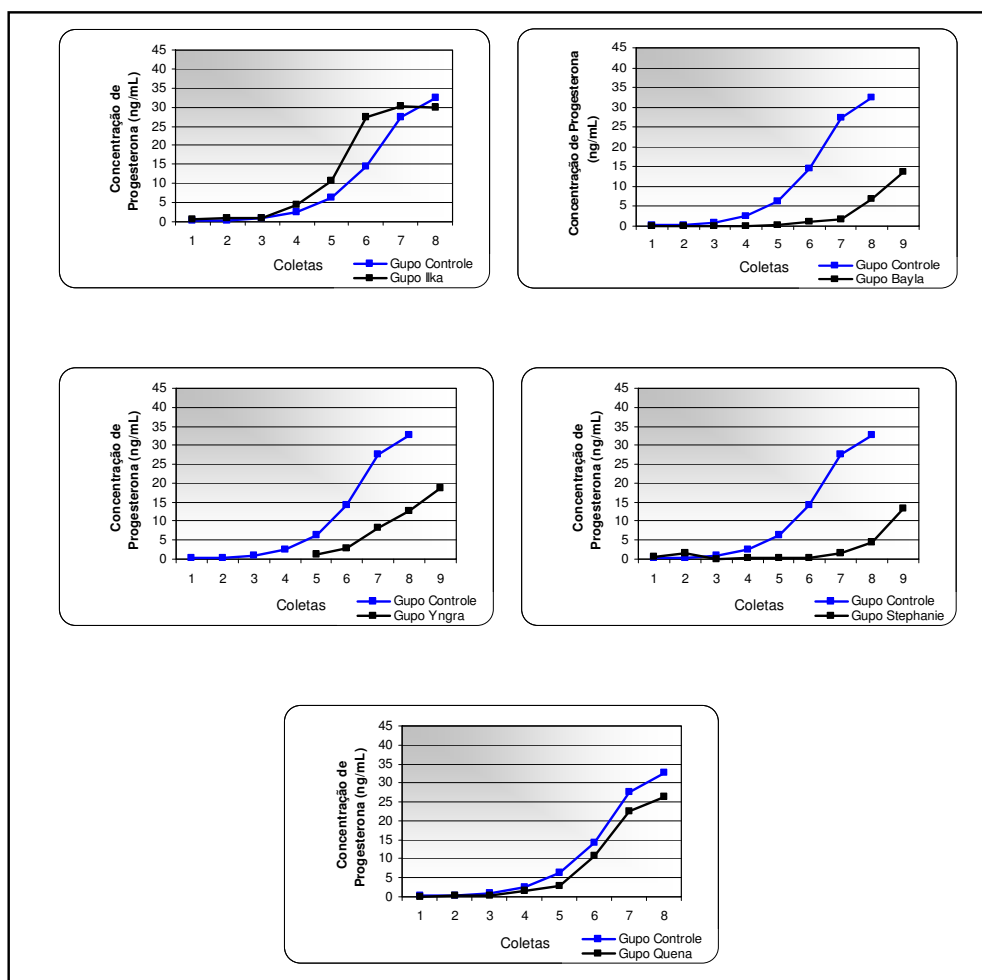


FIGURA 1: Concentrações plasmáticas médias de progesterona das fêmeas do grupo controle frente às concentrações individuais de progesterona das fêmeas do grupo experimental durante as fases de proestro e estro. Cada coleta corresponde a um intervalo de 48 horas. Botucatu, 2009.

Em relação às duas fêmeas pertencentes aos grupos controle e experimental, a curva da progesterona foi maior no estro espontâneo conforme mostra a Figura 3. Essa diferença, possivelmente, foi em virtude de um número maior de folículos ovulados no estro espontâneo, levando a um número maior de corpos lúteos sintetizando progesterona. Além disso, outra hipótese para explicar tal diferença nessa curva é a possibilidade das ovulações ocorrerem mais tardias no estro induzido em relação ao estro espontâneo e, dessa maneira, a formação dos corpos lúteos ocorreria também mais tardiamente e, conseqüentemente, a elevação da progesterona levaria mais tempo para ocorrer.

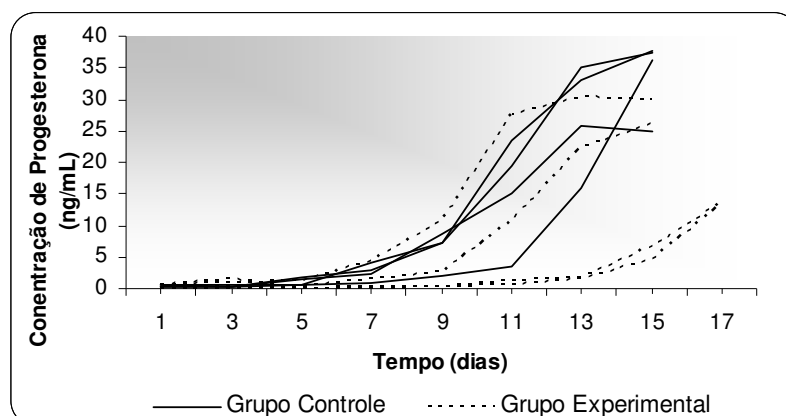


FIGURA 2: Perfil das concentrações plasmáticas de progesterona das fêmeas do grupo controle e do grupo experimental durante as fases de proestro e estro em relação ao tempo (dias) conforme o ciclo estral evolui. O aumento da concentração de progesterona torna-se mais evidente por volta do dia 7, período correspondente ao final do proestro início do estro. Botucatu, 2009.

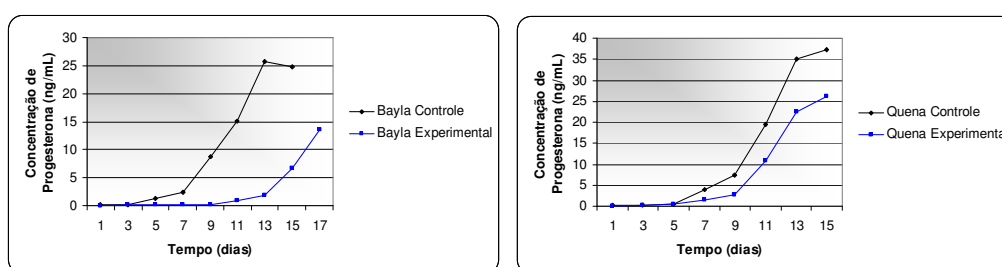


FIGURA 3: Perfil das concentrações plasmáticas de progesterona das 2 fêmeas acompanhadas durante o proestro e estro dos ciclos, espontâneo e induzido. Botucatu, 2009.

A citologia vaginal foi uma das ferramentas utilizadas no presente trabalho para o acompanhamento das fases do ciclo estral. Embora quando utilizada isoladamente não seja um critério fidedigno (JOHNSTON et al. 2001), os esfregaços vaginais associados a outros exames complementares foram utilizados para a detecção das fases do ciclo estral das fêmeas de ambos os grupos.

Os resultados referentes ao perfil citológico eram interpretados de acordo com Feldman e Nelson (2004), que consideram como estro citológico o momento em que o número de células superficiais e/ou escamas é igual ou superior a 80%. Na Figura 4, é possível observar a evolução do padrão citológico concomitantemente ao desenvolvimento do ciclo estral e fica clara a semelhança entre as duas condições.

Os resultados estatísticos dos exames citológicos apontaram uma similaridade entre os grupos, embora os resultados sugiram a existência de um possível retardamento do grupo experimental em relação ao controle quanto ao momento de surgimento da maior porcentagem de células superficiais em relação aos dias do ciclo estral ($p = -0,10$).

Esse resultado indica que os perfis de citologia nos grupos estudados são paralelos ($p = -0,77$) não sendo constatado efeito do grupo ($p = -0,34$). Em síntese, esses resultados apontam que ambos os grupos se comportam de maneira semelhante ao longo do tempo, havendo diferença significativa apenas relacionada ao tempo ($p = <0,0001$).

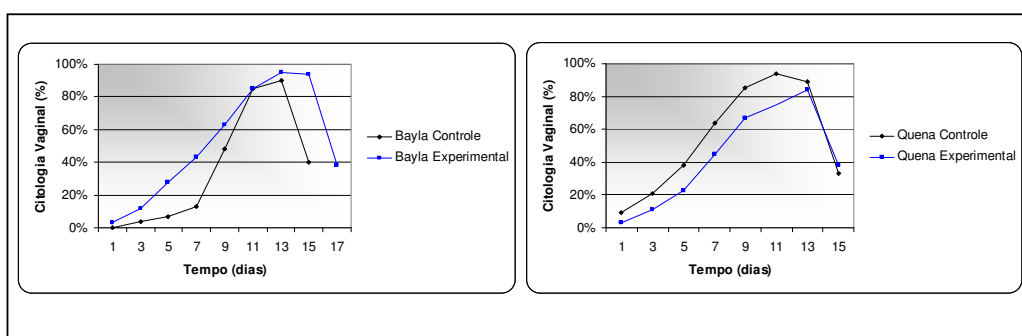


FIGURA 4: Padrão citológico das 2 fêmeas acompanhadas durante o proestro e estro espontâneo e induzido. Botucatu, 2009.

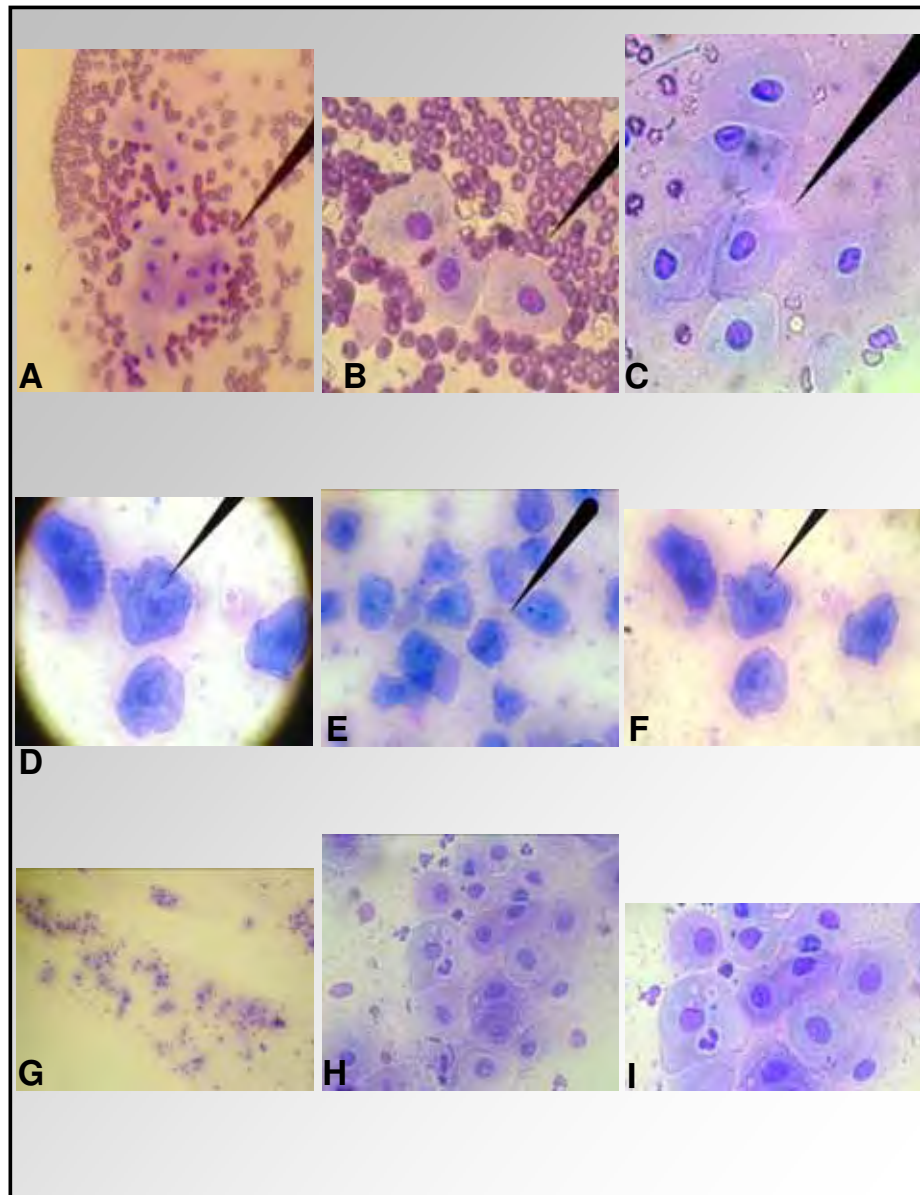


FIGURA 5: Microscopia óptica de esfregaço vaginal de fêmea do grupo controle durante as fases de proestro, estro e início de diestro. **A**, **B** e **C**: células parabasais, intermediárias pequenas e eritrócitos indicando proestro citológico; **D** e **E**: células intermediárias grandes (final do proestro citológico); **F**: células superficiais e escama (estro citológico); **G**: células intermediárias grandes e pequenas, neutrófilos; **H** e **I**: células intermediárias pequenas, células parabasais, neutrófilos, e células do metaestro (início de diestro citológico). Botucatu, 2009.

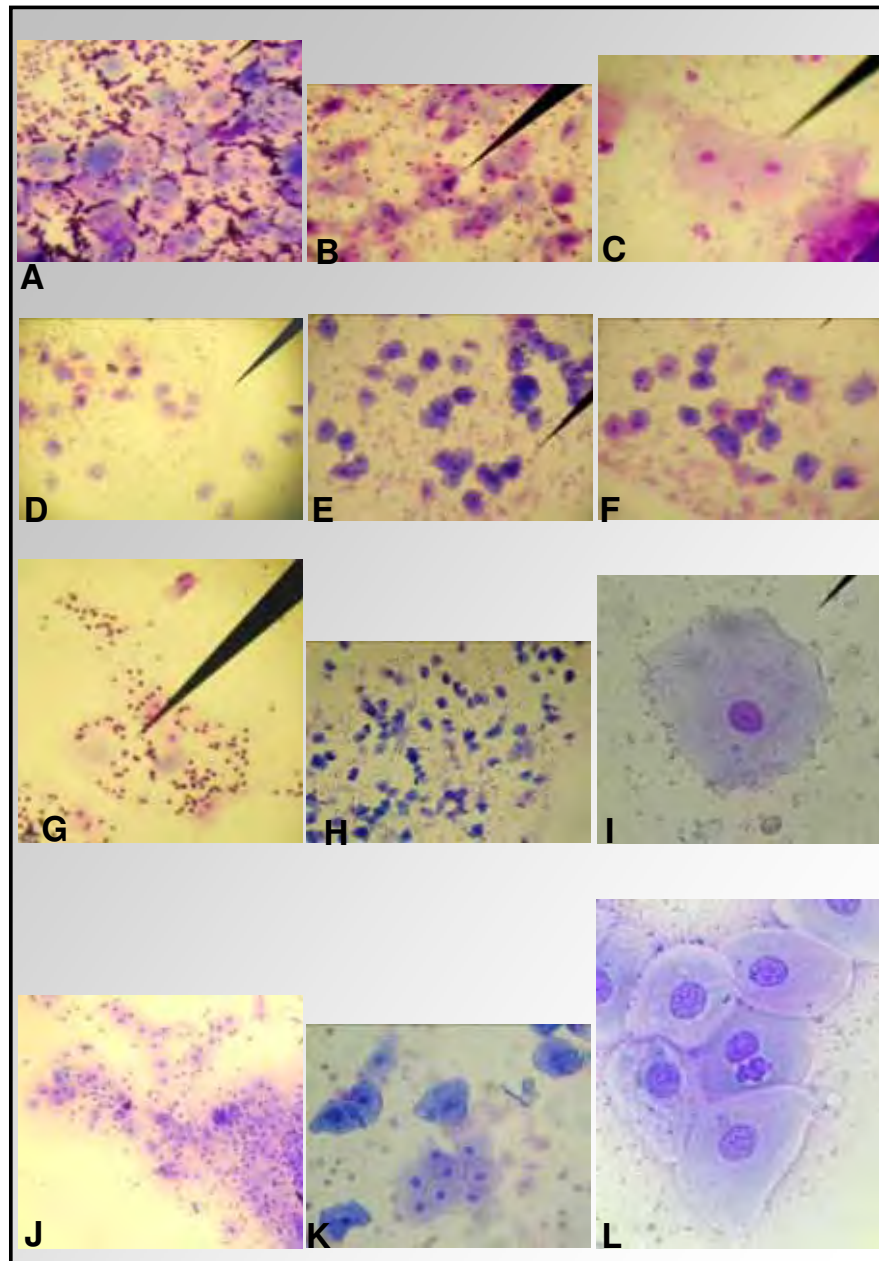


FIGURA 6: Microscopia óptica de esfregaço vaginal de fêmea do grupo experimental durante as fases de proestro, estro e início de diestro. **A**, **B** e **C**: células parabasais, intermediárias pequenas e eritrócitos indicando proestro citológico; **D**, **E** e **F**: células intermediárias pequenas e grandes e eritrócitos (meio do proestro citológico); **G**: células intermediárias grandes e células superficiais (final de proestro citológico); **H**: mais de 80% de células superficiais (estro citológico) **I**: célula superficial; **J** e **K**: células intermediárias pequenas e grandes, células parabasais, neutrófilos (início de diestro citológico); **L**: células intermediárias pequenas, células parabasais e célula do metaestro (diestro citológico). Botucatu, 2009.

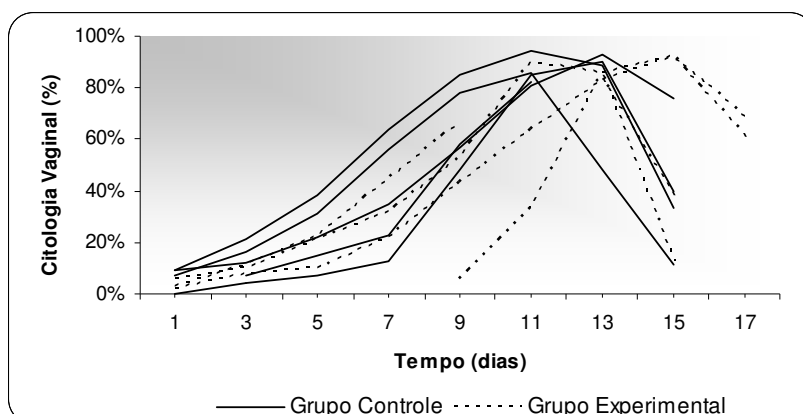


FIGURA 7: Perfil da citologia vaginal das fêmeas do grupo controle e do grupo experimental durante as fases de proestro e estro em relação ao tempo (dias) conforme o ciclo estral evolui. A curva da citologia aumenta durante o proestro onde existe a dominância do estrógeno. Após esse período, a concentração de progesterona aumenta inversamente proporcional ao padrão citológico. Botucatu, 2009.

Na análise de correlação entre as concentrações de progesterona com os demais parâmetros observados, edema vulvar e secreção vaginal, tanto para os animais do grupo controle quanto do grupo experimental. Os resultados mostraram uma correlação negativa entre o escore de progesterona e o edema de vulva para ambos os grupos $r = -0,62$, $p = 0,0088$ (controle) e $r = -0,61$, $p = 0,0055$ (experimental) (Figura 8).

O edema de vulva observado durante o proestro e estro ocorre em virtude da vasodilatação e do aumento da permeabilidade capilar promovido pelo estrógeno (JOHNSTON et al., 2001). Portanto, o edema presente durante essas fases não mantém relação com a progesterona, o que explica a já esperada correlação negativa entre progesterona e edema de vulva.

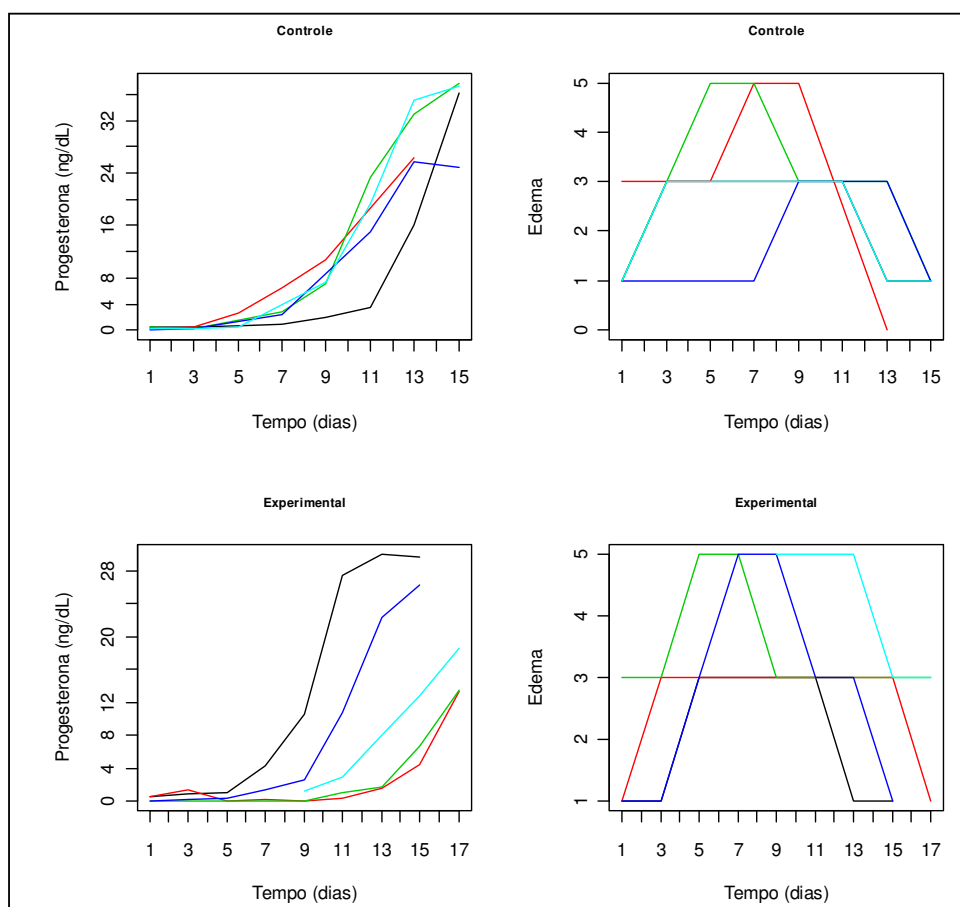


FIGURA 8: Gráficos para visualizar o perfil da progesterona e o escore para edema vaginal durante as fases de proestro e estro, separados por grupo. O escore do edema vaginal apresenta valores de 0 à 5 correspondentes à intensidade observada durante às coletas. Os valores foram separados da seguinte maneira: 0 (ausência -), 1 (leve +), 3 (moderado ++) e 5 (intenso +++). Botucatu, 2009.

Para a correlação entre o escore de progesterona e secreção vaginal, os resultados apontaram não existir correlação significativa para o grupo controle ($r = -0,26$, $p = 0,35$); para o grupo experimental, a correlação foi de $r = -0,52$, $p = -0,52$ (Figura 9). Esse resultado era esperado, já que, assim como o edema de vulva, a secreção vaginal também apresenta correlação com o estrógeno e não com a progesterona. À medida que o estrógeno aumenta durante o proestro, o edema de vulva e a secreção vaginal também aumentam e, conforme a progesterona aumenta durante o final do proestro e estro, os sinais clínicos diminuem (FELDMAN e NELSON, 2004; LACROIX, 2004).

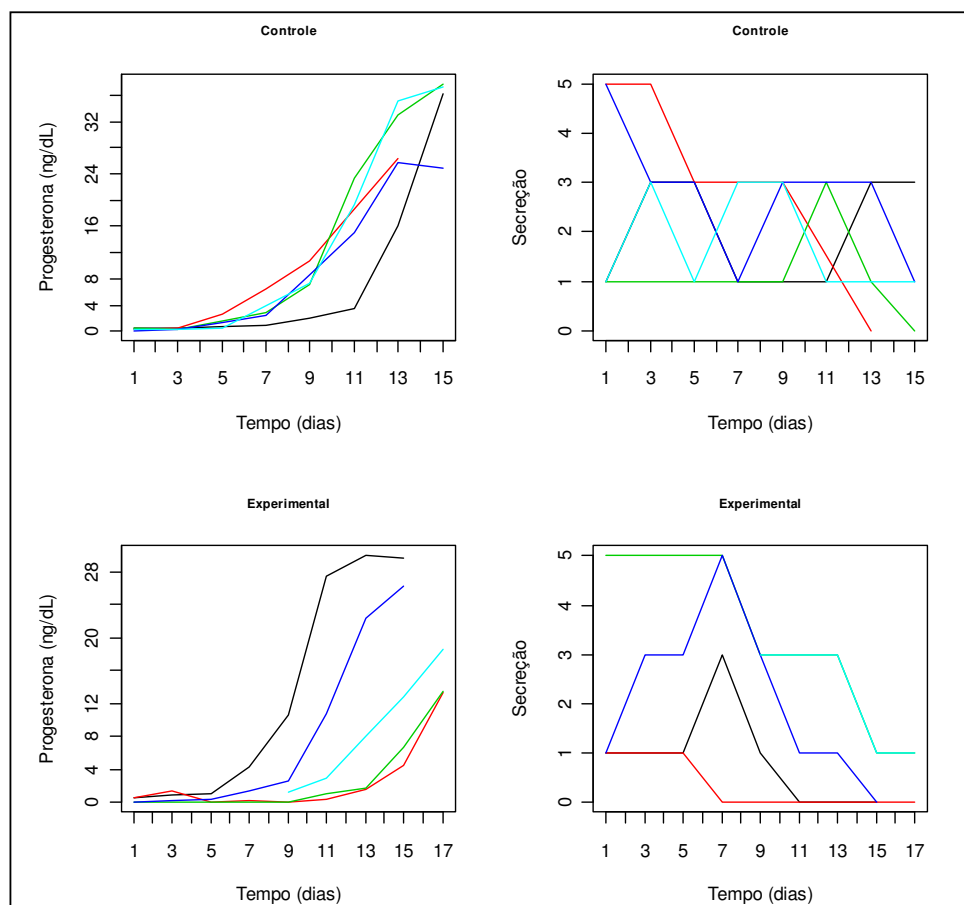


FIGURA 9: Gráficos para visualizar o perfil da progesterona e o escore da secreção vaginal durante as fases de proestro e estro, separados por grupo. O escore da secreção vaginal apresenta valores de 0 à 5 correspondentes à intensidade observada durante às coletas. Os valores foram separados da seguinte maneira: 0 (ausência -), 1 (leve +), 3 (moderado ++) e 5 (intenso +++). Botucatu, 2009.

Os resultados obtidos nesse trabalho foram interessantes e mostraram a eficácia da cabergolina na indução do estro em cadela, visto que em todas as cinco fêmeas submetidas ao tratamento, o estro pode ser observado e acompanhado. Além disso, o IIE pode ser diminuído em até 56 dias, o que pode representar uma melhor adaptação à demanda do mercado.

Embora o tratamento para a indução do estro em cadela ainda seja considerado oneroso, os resultados positivos podem melhorar e facilitar o manejo dos canis e, conseqüentemente, diminuir o custo de produção de filhotes. Além disso, alguns trabalhos estão sendo desenvolvidos para verificar a eficácia do tratamento com cabergolina em baixas dosagens e, dessa maneira, diminuir custo desses tratamentos.

As pesquisas com foco na reprodução dos pequenos animais têm apresentado resultados favoráveis, o que contribui com os avanços biotecnológicos. Assim como nas demais espécies, o completo conhecimento do ciclo estral da espécie canina é fundamental antes de haver a implantação das biotecnologias e, para tal, são necessárias mais pesquisas, cujo enfoque seja a comparação entre o ciclo espontâneo e induzido, a fim de minimizar efeitos colaterais e maximizar os resultados.

Conclusões

A cabergolina quando administrada durante o início anestro é capaz de induzir um estro fértil, uma vez que todas as cinco fêmeas submetidas ao tratamento de indução apresentaram sinais de estro e quatro fêmeas, após cobertura, tornaram-se gestantes e pariram normalmente;

O IIE foi menor em todas as cinco fêmeas tratadas com cabergolina em relação ao estro espontâneo, sendo observado uma diminuição de até 56 dias, ou seja, quase dois meses;

O perfil da progesterona não apresentou diferenças entre os grupos estudados, assim como o padrão citológico. Entretanto, a curva de crescimento da progesterona, em duas das cinco fêmeas, levou mais dias para atingir os mesmos valores obtidos no estro espontâneo;

Os animais tratados com a cabergolina não apresentaram nenhum efeito colateral o que mostra a segurança desse fármaco para a indução do estro.

O presente trabalho possibilitou o acompanhamento e observação do ciclo estral de fêmeas caninas e mostrou uma semelhança entre os estros, espontâneo e induzido, quanto aos: sinais clínicos, mudanças comportamentais, padrão citológico e concentração de progesterona.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à professora Maria Denise Lopes por toda dedicação com a qual me orientou durante o mestrado e pela contribuição dada para a execução e conclusão desse trabalho.

Referências Bibliográficas

- CIRIT, Ü. ,et al. The effects of a low dose of cabergoline on induction of estrus and pregnancy rates in anestrous bitches. **Animal Reproduction Science**, p.1-11, 2006.
- CONCANNON P.W. Canine physiology of reproduction. In: BURK T.J. (Ed) Small animal reproduction and infertility, p. 23-77, Philadelphia: 1986.
- CONCANNON, P.W. Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs. **J Reprod Fertil Suppl**, v.47, p.3-27, 1993.
- CONCANNON, P.W.; VERSTEGEN, J. Estrus induction in dogs: use of gonadotropins, therapies and dopamine agonists. **Proc Ann Meet Soc Theriogenology Montreal**, v.7, p.245, 1997.
- CUNNINGHAM J.G. Tratado de fisiologia veterinária. Ed. Guanabara Koogan, cap.36, p.368-376, Rio de Janeiro: 1999.
- FELDMAN E.C.; NELSON R.W. Canine and feline endocrinology and reproduction. Ed. W.B. Saunders Company, cap.17, p.785. Pennsylvania: 2004.
- GIER, J., et al. Physiology of the Canine and Anoestrous and Methods for Manipulation of Its Length. **Reprod Dom Anim**, v.43 (Suppl. 2), p.157-164, 2008.
- GUNAY, A., et al. Cabergoline applications in early and late anoestrus periods on German Shepherd dogs. **Res Med Vet**, v.155, p.557-560, 2004.
- JEFFCOAT, I.A. Endocrinology of anestrous bitches. **J Reprod Fertil Suppl**, v.47, p.69-76, 1993.
- JOHNSTON S.D., et al. Canine and feline theriogenology. Ed. W. B. Saunders Company, cap. 2, p. 16-31, 2001.
- LACROIX, C.F.E. Endocrinología y fisiopatología de la hembra canina. In: Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos, cap.17, p.175-190, 2004.
- OKKENS, A.C.; KOOISTRA, H.S. Anoestrus in the dog: a fascinating story. **Reprod Dom Anim**, p.291-296, 2006.
- SOKOLOWSKI, J.H. Reproductive patterns in the bitch. **Vet Clin North Am**, v.7, p.653-666, 1977.
- SPATTINI, G., et al. Follicular development and plasma concentrations of LH and prolactina in anestrous female dogs treated with the dopamine agonist cabergolina. **Theriogenology**, v.68, p.826-833, 2007.
- VERSTEGEN, J., et al. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonista cabergoline in dogs. **Theriogenology**, v.51, p.597-611, 1999.

Normas da Revista "Ciência Animal Brasileira" da Universidade Federal de Goiás – UFG

ISSN 1089-6891

Diretrizes para Autores

Os trabalhos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. Os textos devem ser organizados da seguinte forma:

- 1- título;
- 2- nomes dos autores (por extenso);
- 3- filiação científica (informar departamento, instituto ou faculdade, universidade, CEP, cidade, estado país e e-mail);
- 4- resumo (na língua principal do texto e em inglês - Summary, com um máximo de 200 palavras);
- 5- palavras-chave (máximo de cinco, apresentadas na língua do texto e em inglês - Keywords);
- 6- introdução;
- 7- material e métodos;
- 8- resultados e discussão (separados se necessário);
- 9- conclusões;
- 10- agradecimentos (se necessário);
- 11- referências bibliográficas, em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor e seguir a NBR 6023, da ABNT.

Nota Científica (inclui o formato de Relato de Caso, Comunicação de Pesquisa ou Nota Prévia): --Aviso: temporariamente não estão sendo aceitos para submissão artigos destes tipos--

Contempla principalmente áreas médicas ou achados que devam ser divulgados anteriormente à publicação do artigo, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Podem ser considerados como elementos do corpo do texto: Introdução, Material e Métodos ou Casuística (de acordo com a situação), Resultados, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). No geral, essas publicações estão sujeitas às mesmas características de avaliação dos artigos científicos, respeitadas suas peculiaridades.

Itens de Verificação para Submissão

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

1. A contribuição é original, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista;
2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapasse os 2MB). No arquivo da submissão, excluir apenas os nomes e identificação dos autores, todos os outros elementos (título em português e em inglês, resumo, palavras chave, abstract e key words) devem permanecer no arquivo. O preenchimento do cadastro inclui todos os autores envolvidos (máximo de 6 autores), selecionando o contato principal. Atentar para o item 6 destas normas;
3. Todos os endereços de URLs no texto (Ex.: <http://www.ibict.br>) estão ativos e prontos para clicar;
4. O texto está em espaço 1,5 com linhas numeradas; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; 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). Os nomes de TODOS os autores, com sua respectiva identificação institucional, foi cadastrada nos metadados da submissão, usando a opção incluir autor. Em caso de citação de autores, "Autor" e ano são usados na bibliografia, ao invés de Nome do autor, título do documento, etc.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros