

MARTINEZ, A.C. et al. Identificação das fases do ciclo estral, em ovelhas sincronizadas com implantes de progesterona, através do uso de colpocitologia. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 39, Ed. 144, Art. 971, 2010.



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Identificação das fases do ciclo estral, em ovelhas sincronizadas com implantes de progesterona, através do uso de colpocitologia

Antonio Campanha Martinez¹; Thayla Sara Soares Stivari²; Milton Akira Saito Junior¹; Cassiana Ometto de Abreu¹

1 Laboratório de Criação e Reprodução Animal – Universidade Estadual de Maringá – Campus Regional de Umuarama acmartinez@uem.br

2 Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias

Resumo

Além de contribuir para o diagnóstico precoce de patologias reprodutivas do trato genital feminino, a citologia vaginal apresenta-se como uma ferramenta auxiliar no programa de reprodução animal. Este trabalho objetivou verificar o perfil citológico vaginal de ovelhas após a indução do estro. Para sincronização do estro utilizou-se esponjas estéreis intravaginais impregnadas com progesterona, que permaneceram por dois diferentes períodos. Esfregaços vaginais foram confeccionados após a retirada das esponjas, diariamente, durante 25 dias, com auxílio de “swabs” estéreis. Não houve diferença entre os tratamentos quando comparado os tipos celulares encontrados. As fases do ciclo estral não foram possíveis de serem identificadas pelo perfil citológico vaginal.

Identification of estral phases with colpocitology in ewes synchronized with progesterone implants

Abstract

In spite of contributing to the early diagnosis of reproductive disorders of female genital tract, vaginal cytology is presented as an auxiliary tool in animal reproduction program. The goal of this research was studied the vaginal cytological profile from ewes, after the estrus induction. For estrus synchronization, we used sterile intravaginal sponges impregnated with progesterone, which remained for two different periods. Vaginal smears were daily made after sponge removal, for 25 days, with sterile swabs. There was no difference between treatments when comparing the cell types. The vaginal smear profile was not able to identify the estrous cycle phases.

INTRODUÇÃO:

Com o aprimoramento da biotecnologia na reprodução de ovinos, tem-se buscado mecanismos que auxiliem na identificação do ciclo reprodutivo, visando o controle e eficaz aproveitamento do estro e conseqüente gestação. A citologia vaginal, estudada através da colpocitologia, apresenta-se como uma ferramenta auxiliar no programa de reprodução animal, além de contribuir para o diagnóstico precoce de patologias reprodutivas do trato genital feminino.

O estudo da citologia esfoliativa, assim também chamada, introduzida por PAPANICOLAOU (1942), possibilita a observação dos vários tipos celulares vaginais, coincidentes com a fase hormonal correspondente, sofrendo modificações ao longo do ciclo estral (SCHUTTE, 1967), sob influência dos hormônios esteróides E2 (estradiol) e P4 (progesterona), sendo então este padrão citológico um indicador da fase estral.

Segundo Porto et al (2007) a citologia vaginal é um método rápido, simples e economicamente viável, auxiliando assim os programas de inseminação artificial. Quando em conjunto com estudos histológicos vaginais,

é possível estabelecer um perfil para fêmeas gestantes, porém não compete como método de diagnóstico de gestação isolado. (YAMADA, 1998).

Segundo MIES FILHO (1987), a ovelha é um animal de poliestria estacional, apresentando-se de forma cíclica e sequencial, exceto o anestro, que deve ser considerado na espécie ovina. O ciclo estral dura de dezesseis a dezessete dias. Compreendendo as fases de: proestro (de dois a três dias); estro (24 a 36 horas); metaestro (cerca de dois dias); e o diestro (ao redor de doze dias). Durante estes eventos, ocorrem alterações citológicas no epitélio vaginal, onde as camadas celulares, morfológicamente distintas, respondem de acordo com o estímulo hormonal a qual são submetidas. (PORTO, 2007). Sob ação estrogênica, as camadas do epitélio estratificado da vagina, principalmente as mais superficiais, resultam na esfoliação de células queratinizadas

As células do epitélio vaginal são classificadas em basais, parabasais, intermediárias, superficiais com núcleo e superficiais sem núcleo. A presença de neutrófilos são comuns durante a fase não-estrogênica, uma vez que o estímulo estrogênico faz com que o epitélio fique com várias camadas, impedindo assim a migração neutrofílica para o lúmen vaginal. Eritrócitos podem ser visualizados durante as fases de proestro, estro e início do metaestro.

As alterações celulares ao longo do ciclo estral podem ser identificadas através de métodos apropriados de coloração.

Estudos e relatos na literatura a respeito de citologia vaginal, em ovelhas e cabras, para a detecção de estro e diagnóstico de gestação são escassos. Sendo assim, o estudo da fisiologia reprodutiva, no que diz respeito à diferenciação das fases do ciclo estral e à resposta do epitélio vaginal à influência hormonal, torna-se necessário já que a citologia vaginal pode ser um método prático, de fácil execução. Este trabalho objetivou verificar o perfil citológico vaginal de ovelhas após a indução do estro com uso de progestágenos.

MATERIAL E MÉTODOS:

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Criação e Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá, Campus de Umuarama, Paraná, no período de março a julho de 2008. Foram utilizadas dez ovelhas adultas, mantidas sob semi-confinamento. Para sincronização do estro utilizou-se esponjas estéreis intravaginais impregnadas com 60 mg de progesterona (P4), que permaneceram por dois diferentes períodos. No dia da remoção das esponjas aplicou-se 125 µg de cloprostenol sódico, pela via intramuscular. As ovelhas foram separadas em grupos de cinco animais, onde um grupo teve as esponjas retiradas após cinco dias (Grupo D5) e, o outro, após doze dias (Grupo D12).

Esfregaços vaginais foram confeccionados após a retirada das esponjas, diariamente, sempre no mesmo horário, durante 25 dias, com auxílio de "swabs" estéreis. O procedimento consistiu no afastamento dos lábios vulvares da ovelha, seguido da introdução do "swab" na comissura dorsal da vulva, evitando a fossa clitoriana e seguindo em direção dorsocranial. Ao atingir o canal vaginal, o "swab" foi gentilmente rotacionado contra a mucosa, permitindo a coleta das células epiteliais.

Em seguida, o "swab" foi delicadamente rolado sobre as lâminas de vidro e as mesmas foram secas a temperatura ambiente. Para a coloração, foi utilizado o método Panótico Rápido, que consistiu na passagem de cada lâmina na solução: I (solução de Ciclohexadrenos 0,1%, por dez segundos), II (solução de Azobenzenosulfônicos a 0,1%, por dez segundos) e III (solução de Fenotiazinas a 0,1% por vinte segundos), lavados em água corrente de fluxo leve e novamente secos em temperatura ambiente. As lâminas foram então observadas ao microscópio óptico de luz nos aumentos de 400x para a visualização e contagem de 100 células por lâmina. Foram analisadas as células parabasais, intermediárias, superficiais, hemáceas e leucócitos. Para análise dos resultados foi utilizado o teste de Tukey, ao nível de 5% e o procedimento PROC GLM do programa SAS V8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença entre os tratamentos quando comparado os tipos celulares encontrados.

A Tabela 1 demonstra que no tratamento de indução de estro utilizando implantes impregnados com progesterona por 12 (doze) dias, não houve diferença estatística entre os grupos celulares durante todo o tratamento e a presença de células parabasais e intermediárias em todos os esfregaços. A presença de hemáceas no primeiro dia pode ser decorrente de uma reação ao implante vaginal, que permaneceu por um longo período.

Tabela 1: Perfil colpocitológico de ovelhas submetidas a indução de estro com o uso de implantes impregnados com progestágenos durante 12 dias (GrupoD12).

DIA	PARABASAL	INTERMEDIARIA	SUPERFICIAL	LEUCOCITO	HEMACEA
1	26,0 ^a	18,0 ^a	4,6 ^a	8,6 ^a	2,8 ^a
2	40,2 ^a	34,4 ^a	1,8 ^a	2,8 ^a	0,8 ^a
3	47,6 ^a	45,8 ^a	6,2 ^a	0,4 ^a	0,0 ^a
4	42,0 ^a	39,4 ^a	4,2 ^a	2,4 ^a	0,0 ^a
5	40,6 ^a	47,0 ^a	9,6 ^a	2,8 ^a	0,0 ^a
6	32,6 ^a	52,8 ^a	5,4 ^a	9,2 ^a	0,0 ^a
7	31,6 ^a	47,2 ^a	15,0 ^a	6,2 ^a	0,0 ^a
8	43,4 ^a	39,0 ^a	10,8 ^a	6,8 ^a	0,0 ^a
9	53,0 ^a	40,0 ^a	2,6 ^a	4,4 ^a	0,0 ^a
10	37,4 ^a	37,6 ^a	1,0 ^a	4,0 ^a	0,0 ^a
11	51,8 ^a	38,4 ^a	0,4 ^a	7,8 ^a	1,6 ^a
12	44,2 ^a	48,6 ^a	5,8 ^a	1,4 ^a	0,0 ^a
13	51,6 ^a	45,0 ^a	0,8 ^a	2,6 ^a	0,0 ^a
14	47,6 ^a	45,6 ^a	3,6 ^a	2,8 ^a	0,0 ^a
15	41,4 ^a	43,6 ^a	2,0 ^a	13,0 ^a	0,0 ^a
16	43,4 ^a	51,0 ^a	4,8 ^a	0,8 ^a	0,0 ^a
17	45,6 ^a	47,6 ^a	6,6 ^a	0,6 ^a	0,2 ^a
18	36,8 ^a	57,6 ^a	2,6 ^a	3,6 ^a	0,0 ^a
19	49,6 ^a	45,0 ^a	4,2 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
20	54,6 ^a	40,8 ^a	1,2 ^a	2,0 ^a	0,0 ^a
21	32,8 ^a	41,6 ^a	4,6 ^a	1,6 ^a	0,0 ^a
22	33,6 ^a	41,2 ^a	4,2 ^a	0,4 ^a	0,0 ^a
23	26,2 ^a	42,0 ^a	11,0 ^a	0,8 ^a	0,0 ^a
24	37,2 ^a	53,0 ^a	9,2 ^a	0,6 ^a	0,0 ^a
25	33,6 ^a	45,8 ^a	0,6 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística, $p < 5\%$

A Tabela 2 corresponde aos animais do grupo D5. Observou-se que não houve diferença estatística nas células parabasais e intermediárias. Já as células superficiais tiveram diferença entre si, no sexto dia apresentou-se mais elevada com índice de 24,2% das células. No 2º, 11º, 12º, 14º, 17º, 19º, 23º e 25º dias, encontrou-se as menores taxas deste tipo celular, variando de 0 a 1,4%. Também verificou-se diferença na presença de leucócitos ($p < 0,05$), apresentando-se mais elevadas, com índices de 28,8%, no primeiro dia e menores, variando de 0 a 0,4%, nos dias 5º, 6º, 16º e 25º. O acentuado número de leucócitos durante o primeiro e segundo dia indica processo inflamatório local causado pela presença prévia do implante vaginal, decrescendo (15,8 a 0%) nos dias subseqüentes a sua retirada.

Tabela 2: Perfil colpocitológico de ovelhas submetidas a indução de estro com o uso de implantes impregnados com progestágenos durante 05 dias (Grupo D5).

Dia	PARABASAL	INTERMEDIARIA	SUPERFICIAL	LEUCOCITO	HEMACEA
1	31,4 ^a	30,0 ^a	5,0 ^{abc}	28,8 ^a	4,8 ^a
2	46,4 ^a	29,8 ^a	0,8 ^{abc}	23,6 ^{ab}	0,0 ^a
3	42,6 ^a	48,4 ^a	4,4 ^{abc}	4,6 ^{bc}	0,0 ^a
4	36,4 ^a	55,6 ^a	6,0 ^{abc}	1,6 ^{bc}	0,0 ^a
5	28,0 ^a	57,6 ^a	14,2 ^{abc}	0,2 ^c	0,0 ^a
6	26,8 ^a	49,4 ^a	24,2 ^a	0,0 ^c	0,0 ^a
7	28,4 ^a	47,8 ^a	10,8 ^{abc}	4,4 ^{bc}	0,0 ^a
8	24,0 ^a	50,4 ^a	22,8 ^{ab}	1,6 ^{bc}	0,0 ^a
9	35,8 ^a	47,4 ^a	9,6 ^{abc}	7,2 ^{abc}	0,0 ^a
10	38,4 ^a	53,8 ^a	2,8 ^{abc}	5,0 ^{bc}	0,0 ^a
11	32,2 ^a	60,2 ^a	0,2 ^c	7,4 ^{abc}	0,0 ^a
12	30,2 ^a	62,0 ^a	1,4 ^c	6,4 ^{abc}	0,0 ^a
13	41,0 ^a	50,0 ^a	3,0 ^{bc}	6,0 ^{abc}	0,0 ^a
14	39,4 ^a	55,2 ^a	0,0 ^c	5,4 ^{bc}	0,0 ^a
15	34,8 ^a	56,2 ^a	4,0 ^{abc}	5,0 ^{bc}	0,0 ^a
16	45,4 ^a	51,2 ^a	3,0 ^{bc}	0,4 ^c	0,0 ^a
17	46,0 ^a	49,0 ^a	0,2 ^c	3,6 ^{bc}	0,0 ^a
18	44,2 ^a	52,6 ^a	1,0 ^c	2,2 ^{bc}	0,0 ^a
19	29,4 ^a	53,8 ^a	1,0 ^c	15,8 ^{abc}	0,0 ^a
20	32,0 ^a	53,8 ^a	5,8 ^{abc}	8,4 ^{abc}	0,0 ^a
21	49,6 ^a	36,0 ^a	9,2 ^{abc}	5,0 ^{bc}	0,0 ^a
22	34,8 ^a	51,2 ^a	12,8 ^{abc}	1,2 ^{bc}	0,0 ^a
23	26,2 ^a	43,8 ^a	0,8 ^c	3,4 ^{bc}	0,0 ^a
24	25,8 ^a	42,0 ^a	2,6 ^{bc}	9,6 ^{abc}	0,0 ^a
25	13,4 ^a	24,4 ^a	1,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^a

MARTINEZ, A.C. et al. Identificação das fases do ciclo estral, em ovelhas sincronizadas com implantes de progesterona, através do uso de colpocitologia. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 39, Ed. 144, Art. 971, 2010.

As fases do ciclo estral não foram possíveis de ser identificadas pelo perfil citológico vaginal, possivelmente devido o uso dos implantes, que podem ter gerado uma alteração focal do epitélio do vaginal.

CONCLUSÃO

A colpocitologia não permitiu a diferenciação das fases do ciclo estral de ovelhas quando utilizado implantes de progestágenos por cinco ou doze dias de permanência.

REFERÊNCIAS

MENDONÇA, F.S.; EVÊNCIO-NETO, J.; SIMÕES, M. J.; CAMARGO, L.M.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.. Aspectos citopatológicos da mucosa vaginal de camundongas tratadas com progesterona. **Ciência Animal Brasileira**. V.8, n.2, p.313-318, abr/jun. 2007.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais**. v. 1 e 2. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987.

PAPANICOLAOU, G. N. A new procedure for staining vaginal smears. **Science**, v. 95, p.438-439, 1942

PORTO, R.R.M.; CALVACANTE, T.V.; DIAS, F.E.F.; ROCHA, J.M.N; SOUZA, J.A.T.. Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça Santa Inês no acompanhamento do ciclo estral. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.3, p. 521-527, jul./set. 2007.

SCHUTTE, A. P. Canine vaginal cytology II – Cyclic changes. **Journal of Small Animal Practice**, v. 8, p.307-311, 1967.

YAMADA, M.L.; KOZICKI, L.F. Contribuição ao estudo do diagnóstico de gestação em *Capra hircus*, através da histologia e citologia do epitélio vaginal. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v.35, n.6, p. 246-251, 1998.