

Leonardo Lara e Lanna

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DESLORELINA NA INDUÇÃO DE
ESTRO EM CADELAS NO ANESTRO**

Dissertação apresentada na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal
Orientador: Prof. Antônio de Pinho Marques Júnior

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2008

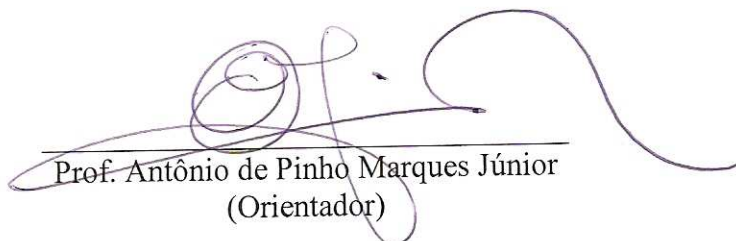
L292e Lanna, Leonardo Lara e, 1983-
Efeito da administração de deslorelina na indução de estro em cadelas no anestro /
Leonardo Lara e Lanna. – 2008
50 p. : il.

Orientador: Antônio de Pinho Marques Júnior
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

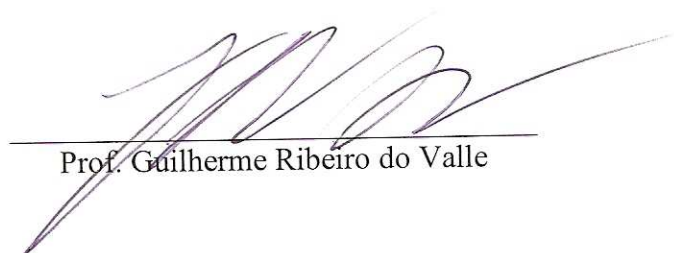
1. Cadela – Reprodução – Teses. 2. Estro – Teses. 3. Ciclo estral – Teses. 4. Reprodução
Animal – Teses. I. Marques Júnior, Antônio de Pinho. II. Universidade Federal de Minas
Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.708 926

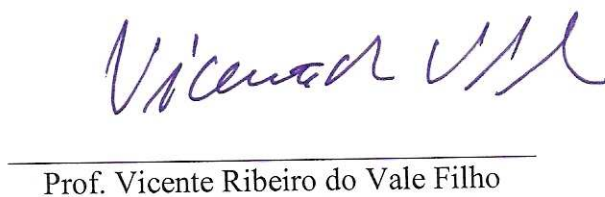
Dissertação defendida e aprovada em 30 de janeiro de 2008, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Antônio de Pinho Marques Júnior
(Orientador)



Prof. Guilherme Ribeiro do Valle



Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho

*Dedico este trabalho
Aos meus pais e
Ao meu irmão*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma maneira, colaboraram para a realização deste trabalho, e de forma particular:

Aos meus pais, Oiliam e Zanja, pelo apoio e incentivo incondicionais em todos os momentos.

Ao meu irmão Luciano, pela amizade inestimável.

À Rebeca, pelo amor e carinho durante esses anos.

Ao Professor Antônio de Pinho Marques Jr., pela valiosa orientação e ensinamentos, tanto acadêmicos, profissionais, quanto pessoais.

À Maria Raquel Moura e Fabrícia Pontes Cury, pelo convívio e amizade durante o mestrado, além das colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Robert H. Douglas e à Dra. Beatriz Bringel, do BET Labs, por conceder a solução de deslorelina e pelas sugestões valiosas durante o trabalho.

À Andréia, do canil Love's Dog, pela hospedagem e carinho com os animais utilizados no experimento.

À Sílvia Cardoso, pela ajuda na coleta de material e manuseio diário dos animais durante o experimento.

A todos os professores e colegas do Setor de Reprodução Animal da EV-UFMG, que contribuíram para o meu crescimento acadêmico.

À Nilda e Débora, da Secretaria de Pós-Graduação da EV-UFMG, pela disponibilidade.

Aos colegas da Clínica Veterinária Santo Agostinho, pela amizade e compreensão durante todo o período do mestrado.

A todos o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. HIPÓTESE	13
3. OBJETIVOS	13
4. REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1. Fisiologia e endocrinologia do ciclo estral	14
4.2. Mecanismo fisiológico de desencadeamento do proestro	17
4.3. Indução de estro em cadelas	19
4.3.1. <i>Indicações para indução de estro</i>	19
4.3.2. <i>Métodos de indução de estro</i>	20
4.4. GnRH e seus análogos	20
4.4.1. <i>Deslorelina</i>	23
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1. Animais	26
5.2. Grupos experimentais e tratamento com deslorelina	26
5.3. Avaliação clínica e comportamento sexual	26
5.4. Citologia vaginal	27
5.5. Concentração plasmática de progesterona	27
5.6. Ovariectomia	27
5.6.1. <i>Avaliação macroscópica, colheita e preservação de útero e ovários</i>	27
5.7. Delineamento experimental e análise dos dados	28
6. RESULTADOS	29
6.1. Avaliação clínica, comportamento sexual e citologia vaginal	29
6.2. Concentração plasmática de progesterona	30
6.3. Avaliação macroscópica de útero e ovários	31
7. DISCUSSÃO	37
8. CONCLUSÕES	40
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
10. ANEXOS	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Incidência da resposta reprodutiva em cadelas, nos diferentes grupos, e o tempo decorrido, em dias, até o aparecimento dos eventos, expresso em média \pm desvio-padrão	30
-----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Concentração plasmática de progesterona da Cadela 1, 33 tratada com dose única de deslorelina, sem manifestação de proestro.
Figura 2.	Concentração plasmática de progesterona da Cadela 2, 33 tratada com dose única de deslorelina, sem manifestação de proestro.
Figura 3.	Concentração plasmática de progesterona da Cadela 3, 33 tratada com dose única de deslorelina, sem manifestação de proestro.
Figura 4.	Concentração plasmática de progesterona da Cadela 4, 34 tratada com dose única de deslorelina, com manifestação de proestro.
Figura 5.	Concentração plasmática de progesterona da Cadela 5, 34 tratada com dose única de deslorelina, com manifestação de proestro.
Figura 6.	Concentração plasmática de progesterona da Cadela 6, 34 tratada com múltiplas injeções de deslorelina, com manifestação de proestro, estro, ovulação e fase luteal.
Figura 7.	Concentração plasmática de progesterona da Cadela 7, 35 tratada com múltiplas injeções de deslorelina, com manifestação de proestro, estro, ovulação e fase luteal.
Figura 8.	Concentração plasmática de progesterona da Cadela 8, 35 tratada com múltiplas injeções de deslorelina, com manifestação de proestro, estro, ovulação e fase luteal.
Figura 9.	Concentração plasmática de progesterona da Cadela 9, 36 tratada com múltiplas injeções de deslorelina, com manifestação de proestro.
Figura 10.	Concentração plasmática de progesterona da Cadela 10,..... 36 tratada com múltiplas injeções de deslorelina, com manifestação de proestro e estro anovulatório.

RESUMO

Avaliou-se a eficácia de uma formulação injetável de deslorelina (agonista do GnRH) na indução de estro em cadelas em anestro e seus efeitos no aparelho genital, utilizando uma ou múltiplas administrações. Treze animais compuseram os grupos: G1 (n=5, 2,0mg de deslorelina via IM), G2 (n=5, quatro injeções IM de 2,0mg de deslorelina em dias alternados) e Grupo Controle (n=3, quatro injeções IM de solução salina em dias alternados). Foram realizadas avaliações clínicas diárias do comportamento sexual, da citologia vaginal, dosagem de progesterona plasmática, ovariectomia e avaliação macroscópica do útero e ovários. No Grupo 1 as cadelas não exibiram sinais de estro, mas duas apresentaram sinais clínicos e citologia vaginal compatíveis com proestro. No Grupo 2 todas apresentaram sinais de proestro, quatro de estro e três ovularam, resultando em corpos lúteos funcionais e concentrações de progesterona elevadas até o 25º dia de diestro, quando foi realizada a ovariectomia. A duração das fases do ciclo induzido pela deslorelina e a curva de progesterona foram semelhantes às descritas na literatura. Não foi observado efeito colateral do tratamento. Concluiu-se que a formulação injetável de deslorelina foi eficaz na indução de estro em cadelas em anestro, com múltiplas aplicações.

Palavras-chave: deslorelina, indução de estro, cadelas.

ABSTRACT

The efficacy of an injectable formulation of deslorelin (a GnRH agonist) was evaluated to induce estrus in anestrus bitches, with one or multiple deslorelin doses. Thirteen animals composed three groups: G1 (n=5, single IM injection of 2,0mg of deslorelin), G2 (n=5, four IM injections of 2,0mg of deslorelin in alternate days) and Control Group (n=3, four IM saline injections in alternate days). Daily clinical evaluations, sexual behavior, vaginal cytology, plasma progesterone concentration, ovariectomy and macroscopic evaluation of the uterus and ovaries were done. In G1 none of the bitches showed signs of estrus, while two developed clinical signs and vaginal cytology of proestrus. In G2 all animals presented proestrus, four presented estrus and three ovulated, resulting in a functional corpora lutea, and high progesterone concentration until day 25 of diestrus, when ovariectomy was performed. The duration of the stages of deslorelin induced cycles and the progesterone curve were similar to those described in the literature, and no side effects were observed. In conclusion, deslorelin injectable formulation was effective to induce fertile estrus in anestrus bitches, with multiple injections.

Key words: deslorelin, induction of estrus, bitches.

1. INTRODUÇÃO

O cão vem se tornando uma espécie de grande interesse para pesquisadores e estudiosos por ser considerado um modelo útil a ser transportado para canídeos selvagens e por apresentar, cada vez mais, valor afetivo e comercial, principalmente nas grandes metrópoles, na medida em que há um crescimento do número de pessoas que optam por viverem sós e que adotam animais de companhia (Gobello e Corrada, 2003).

Dados de 2004 da Anfal Pet (Associação Nacional dos Fabricantes de Ração para Pequenos Animais) estimam que no Brasil existam cerca de 27,9 milhões de cães. Segundo estimativas do IBOPE (Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística), cerca de 59% dos domicílios possuem pelo menos um animal de estimação. A proporção cão:habitante vem crescendo continuamente e, em alguns Estados, a razão é de um cão para cada sete habitantes. Esse elevado número de animais de estimação levou ao desenvolvimento de uma enorme indústria de produtos para “Pets”, com a indústria de “Pet Food” (rações para cães) sozinha faturando, em 2004, cerca de US\$ 1,5 bilhões, com um crescimento de 20,4% em relação ao ano anterior.

Todo esse crescimento e valorização dos animais de companhia só foram possíveis pelo desenvolvimento e divulgação da cinofilia, com o aparecimento de profissionais que criaram canis especializados e confiáveis. Entretanto, a biotecnologia reprodutiva do cão é uma das menos desenvolvidas ou utilizadas entre as espécies domésticas, principalmente em função da singularidade de sua fisiologia (Gobello e Corrada, 2003).

O controle do ciclo estral em cadelas, principalmente a indução e sincronização de estro e ovulação, é fundamental para a

aplicação de biotécnicas de reprodução assistida. O desenvolvimento de um método eficiente e previsível de indução de estro representa um passo importante na terapêutica clínica e na criação comercial de cães. A indução de estro é ferramenta indispensável no tratamento clínico de anestro primário e secundário, permitindo a reprodução de cadelas com valor comercial ou afetivo.

O controle farmacológico dos ciclos estrais pode contribuir na otimização de lucros da cinofilia, permitindo ajustes de calendário e logística dos criadores, maior frequência e número de nascimentos por ano. A ausência de protocolos confiáveis de indução e sincronização de ovulação é, ainda, o maior entrave para a transferência de embriões caninos, biotécnica rotineiramente utilizada em outras espécies domésticas.

Outro papel importante das pesquisas sobre controle reprodutivo em cães é a extrapolação de resultados para espécies de canídeos selvagens, cuja fisiologia está intimamente relacionada. O cão serve como modelo experimental e tais estudos podem fornecer métodos de reprodução assistida preciosos na luta contra a extinção dessas espécies cada vez mais ameaçadas.

Diversas drogas vêm sendo testadas nos últimos anos e os resultados são extremamente variáveis. Até os dias atuais, nenhum dos métodos avaliados mostrou aplicação prática e repetibilidade necessárias para utilização comercial e na rotina clínica. Dentre os medicamentos atualmente disponíveis, os análogos ou agonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) têm demonstrado potencial para utilização no controle do ciclo estral. A deslorelina é um agonista sintético do GnRH e apresenta potência e estabilidade muitas vezes maior que o hormônio natural. Ela tem

sido amplamente utilizada na indução de ovulação em éguas. O seu mecanismo de ação envolve estimulação direta da hipófise e liberação de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), promovendo resposta ovariana subsequente. Por outro lado, estimulação contínua e prolongada resulta em regulação negativa e inibição da atividade hipofisária e ovariana.

Em cães, a deslorelina vem sendo testada tanto na indução de estro quanto no sentido oposto, de contracepção. A forma de apresentação inicialmente desenvolvida foi a de implantes subcutâneos de liberação lenta. Recentemente foi desenvolvida uma

formulação injetável de curta ação, testada primeiramente em éguas, que despertou interesse nos estudos de indução de estro em cadelas.

Com base na literatura e no potencial dos análogos do GnRH na indução de estro em cães, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito de uma formulação injetável intramuscular de deslorelina em cadelas em anestrose. Foram testados dois protocolos, um de aplicação única e outro de injeções múltiplas, na tentativa de avaliar a eficácia da deslorelina na indução de estro e ovulação, bem como demais efeitos sobre o aparelho genital feminino.

2. HIPÓTESE

A deslorelina administrada em múltiplas aplicações, por via intramuscular, é eficaz

para induzir estro em cadelas em anestrose.

3. OBJETIVOS

a) Avaliar a eficácia da deslorelina na indução de estro em cadelas em anestrose;

b) Comparar o efeito de aplicação única ou múltipla de deslorelina em cadelas em anestrose;

c) Descrever características do ciclo estral de cadelas submetidas à indução de estro com deslorelina;

d) Descrever aspectos macroscópicos de útero e ovários de cadelas submetidas à indução de estro com deslorelina.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. *Fisiologia e endocrinologia do ciclo estral*

O cão é uma espécie com características reprodutivas únicas dentre as espécies domésticas. A cadela apresenta, geralmente, ciclo monoestral, não sazonal, caracterizado por lenta mudança entre as fases do ciclo e um longo período variável de anestro fisiológico, em ciclos com ou sem gestação (Concannon, 1993; Hoffmann et al., 1996; Gobello e Corrada, 2003).

A idade à puberdade de cadelas é muito variável, não somente entre raças, como entre indivíduos de mesma raça. Mesmo em ambiente controlado, o primeiro proestro pode ocorrer tão cedo quanto seis meses e tão tarde quanto treze meses de idade (Concannon, 1987). É normal que cadelas de algumas raças de grande porte apresentem o primeiro ciclo estral após 18 a 24 meses (Feldman e Nelson, 2004).

Cadelas apresentam estro durante todo o ano, evidenciando pouca ou nenhuma influência da sazonalidade ou fotoperíodo sobre o ciclo ovariano (Bouchard et al., 1991b). Algumas raças, como o Basenji e o Mastiff Tibetano, ainda apresentam um ciclo estral por ano, tal como os seus ancestrais selvagens (Concannon, 1993; Kutzler, 2007).

O ciclo estral da cadela é dividido em quatro fases, *proestro*, *estro*, *diestro* e *anestro*, e é cerca de dez vezes mais longo que a média dos animais domésticos, especialmente a fase de anestro (Feldman e Nelson, 2004).

O perfil hormonal da cadela durante o ciclo estral difere acentuadamente do observado para outras espécies domésticas, principalmente no que diz respeito às elevadas concentrações de progesterona durante o estro e o diestro, semelhante no

animal gestante e não gestante (Christiansen, 1988).

Outra peculiaridade da cadela em relação às outras espécies domésticas é que a gestação não prolonga a fase de diestro, mas ao contrário, animais não gestantes demoram um pouco mais a atingir novamente concentrações basais de progesterona (Concannon et al., 1989; Hoffmann et al., 2004).

Animais domésticos como a égua, a vaca e a porca, durante a fase reprodutiva, quando não gestantes, apresentam ciclos estrais contínuos, retornando ao estro a cada três semanas (Hafez e Hafez, 2000). A cadela, em contraste, apresenta intervalos interestrais, período decorrido entre o fim de um ciclo estral e o início de outro, normalmente variando entre cinco e onze meses, embora tenham sido relatados ciclos férteis com treze meses de duração (Concannon, 1987) e ciclos férteis que duram apenas quatro meses (Feldman e Nelson, 2004).

Por outro lado, excluindo-se variações características de algumas raças, intervalos interestrais muito curtos ou muito longos são, em geral, associados à infertilidade ou subfertilidade. Além disso, cadelas com intervalo interestral maior do que a média terão menos oportunidades de ficarem gestantes ao longo da vida reprodutiva (Chakraborty et al., 1982).

O proestro na cadela é considerado o intervalo entre o aparecimento de corrimento vaginal sanguinolento e o início da aceitação do macho pela fêmea, com duração, geralmente, de seis a onze dias. É o período de maior crescimento folicular e precede o estro. Algumas mudanças comportamentais são vistas na cadela durante o proestro. Ela se torna mais ativa e brincalhona, passando a

atrair o macho, embora não permitindo a cópula (Concannon et al., 1989). Além de mudanças comportamentais, os sinais que marcam o início do proestro são o aparecimento de corrimento vaginal sanguinolento, edema e turgidez da vulva (Feldman e Nelson, 2004).

Endocrinologicamente, o início do proestro na cadela é marcado por elevada concentração de estrógeno em consequência do desenvolvimento folicular. Durante o anestro alguns folículos iniciam o desenvolvimento, mas este só se completa quando o estímulo gonadotrófico é adequado e os folículos adquirem capacidade de sintetizar estrógeno. No anestro a concentração sérica de estrógeno circulante varia de 5 a 15 pg/mL (Jeffcoate, 1993). No proestro essa concentração aumenta progressivamente, atingindo pico de concentração máxima (60 a 70 pg/mL) 24 a 48 horas antes do pico de LH, para então gradativamente retornar a concentrações basais (Onclin et al., 2002; Feldman e Nelson, 2004). Concentrações crescentes de estrógeno durante o proestro inicial inibem a secreção de LH, permitindo acúmulo do mesmo para liberação durante a onda pré-ovulatória (Concannon et al., 1979b). As relações temporais entre os hormônios reprodutivos durante o ciclo estral canino têm sido estudadas (De Gier et al., 2006).

Diversos órgãos e tecidos são afetados pelo aumento de estrógeno no proestro. Entre eles podemos citar o desenvolvimento de ductos e túbulos das glândulas mamárias, proliferação das fímbrias tubárias, espessamento da tuba uterina, alongamento dos cornos uterinos, espessamento do endométrio, aumento da atividade miometrial, alargamento da cérvix, alongamento e edema da vagina e proliferação da parede vaginal (Concannon, 1987; Feldman e Nelson, 2004). A preparação para a implantação embrionária envolve o espessamento e aumento da atividade glandular do endométrio,

mudanças essas associadas ao sangramento uterino e descarga vaginal típica do proestro (Feldman e Nelson, 2004).

Com o desenvolvimento e maturação folicular, é observada uma pequena, mas detectável luteinização pré-ovulatória dos folículos, quando então ocorre uma queda na produção de estrógeno e contínuo aumento da produção de progesterona. A elevação da concentração plasmática de progesterona pode ser detectada até quatro dias antes do início do estro, diferentemente do observado em outras espécies domésticas (Concannon et al., 1977).

O estro na cadela é tido como o período em que a fêmea aceita a monta pelo macho e permite a cópula, com duração média de cinco a nove dias, embora cadelas férteis possam apresentar estro variando entre dois e vinte dias de duração. Normalmente nessa fase o corrimento vaginal passa de sanguinolento a transparente e a vulva torna-se flácida e pálida, embora ainda edemaciada (Feldman e Nelson, 2004).

No início do estro, as concentrações de progesterona encontram-se entre 1,0 e 2,0ng/mL. Após ovulação, com a formação do corpo lúteo, essa concentração se eleva rapidamente para valores acima de 10,0ng/mL e pode terminar o estro com mais de 20,0ng/mL (Feldman e Nelson, 2004). Concentrações crescentes de progesterona são encontradas durante todo o estro, embora a formação do corpo lúteo só esteja completa por volta de 25 dias após a ovulação (Concannon et al., 1977; Concannon et al., 1987).

O declínio da razão estrógeno:progesterona no final do proestro é o principal fator desencadeador das mudanças comportamentais, endócrinas e fisiológicas vistas na cadela durante o estro. A queda nas concentrações séricas de estrógeno e gradativo aumento nas de progesterona desencadeia um mecanismo de

retroalimentação positiva no hipotálamo e hipófise, resultando na secreção maciça de LH, acompanhada por aumento de FSH. Um acentuado e transitório pico na concentração sérica de LH está presente 24 a 48 horas antes da ovulação (Concannon et al., 1977; Concannon et al., 1979a; Concannon, 1993). A onda pré-ovulatória de LH resulta em uma depleção dos estoques de LH hipofisário, que permanece por 30 dias ou mais (Fernandes et al., 1987).

Na cadela ocorre a ovulação de ovócitos primários. Normalmente tem-se a ovulação de 2 a 15 ovócitos, que passam por um período de maturação de aproximadamente 48 horas até completarem a segunda divisão meiótica (Feldman e Nelson, 2004). Folículos imaturos incapazes de ovular após o pico de LH sofrem atresia. Após a ruptura dos folículos, ocorre rápida luteinização e reorganização para formação de corpos lúteos maduros. Corpos lúteos são pequenas estruturas brilhantes de coloração rosa-salmão facilmente identificáveis na superfície ovariana (Feldman e Nelson, 2004).

O diestro na cadela caracteriza-se pela fase de dominância progesterônica, cuja concentração alcança seu máximo 20 a 30 dias após a ovulação (Concannon et al., 1975). Na gestação a progesterona se mantém elevada por 1 a 2 semanas, quando inicia uma queda progressiva até o parto, apesar do corpo lúteo persistir por todo o período gestacional. As concentrações de progesterona durante esse período variam entre 15,0 e 90,0ng/mL (Concannon et al., 1989). A fase luteal da cadela é mais longa em animais não gestantes, apesar das características hormonais serem semelhantes entre gestantes e não gestantes. Na cadela gestante a fase luteal termina abruptamente com o parto, cerca de 64 a 66 dias após o pico de LH. Já nas não gestantes a mudança de fase é mais lenta, podendo durar até 100 dias, quando então a concentração de progesterona atinge valor menor que

1,0ng/mL (Onclin e Verstegen, 1997; Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004; Hoffmann et al., 2004).

O útero responde às elevadas concentrações de progesterona mantendo sua estrutura glandular e vascularização requerida para a gestação. O tamanho máximo do útero não gestante é alcançado 20 a 30 dias após o início do estro, coincidindo com o platô de progesterona (Feldman e Nelson, 2004). Nessa fase ocorre também o desenvolvimento glandular do tecido mamário (Feldman e Nelson, 2004; Hoffmann et al., 2004).

O perfil de prolactina é observado de maneira inversa ao da progesterona, elevando-se na segunda metade da gestação e atingindo o pico máximo durante o parto, com valores dez vezes maiores que em qualquer outra fase do ciclo. A prolactina é responsável pelo desenvolvimento mamário e sua atividade secretória (De Coster et al., 1983). Ocorrem variações na concentração de prolactina durante a lactação em resposta a sucção (Concannon et al., 1987).

O mecanismo de luteólise na cadela ainda não é bem entendido. O útero aparentemente não está envolvido na regulação da duração da fase luteal, visto que a histerectomia não prolonga a vida do corpo lúteo (Okkens et al., 1985). Alguns estudos indicam que o corpo lúteo na cadela independe de suporte hipofisário até aproximadamente 30 dias após a ovulação (Okkens et al., 1986; Hoffmann et al., 2004), embora outros sugerem que o LH é um importante fator luteotrófico e que o corpo lúteo depende de concentração basal de LH no início de seu desenvolvimento e, possivelmente, durante toda sua vida ativa (Concannon, 1980; Concannon, 1993). Outros autores acreditam que a prolactina seja o principal fator responsável pela manutenção do corpo lúteo na segunda metade da fase luteal (Concannon et al., 1987; Okkens et al., 1990). Possivelmente, ambos desempenham

papel importante na manutenção do corpo lúteo funcional (Hoffmann et al., 2004).

A administração de agonistas dopaminérgicos pode causar luteólise após 30 dias da ovulação, por inibição da síntese de prolactina (Onclin et al., 1993). A prostaglandina-F_{2α} exógena também tem ação luteolítica na cadela, entretanto ela não é capaz de provocar luteólise em corpos lúteos jovens (Johnston et al., 2001).

Após o diestro, o endométrio inicia um processo de reparação, que requer um a três meses para estar completo, sendo considerado um fator relevante para o longo período de anestro na cadela (Feldman e Nelson, 2004). Modificações histológicas no endométrio, durante a involução uterina, podem durar até 135 dias após o parto. Se o animal apresentar estro neste período de involução e o mesmo for aproveitado para monta ou inseminação, pode ocorrer falha na implantação e, conseqüentemente, infertilidade ou menor tamanho da ninhada (Andersen e Simpson, 1973; Jeukenne e Versteegen, 1997; Kutzler, 2007).

O anestro é a fase que sucede o diestro, na qual ocorre a involução uterina e o aparelho reprodutivo se prepara para um novo ciclo estral (Feldman e Nelson, 2004). A duração é bastante variável entre raças, indivíduos e até mesmo entre ciclos de uma mesma cadela, variando de três a dez meses (Bouchard et al., 1991b; Concannon, 1993; Versteegen et al., 1999). Durante essa fase, a concentração de progesterona atinge valores basais, menores que 0,5ng/mL, bem como a concentração de estrógeno, embora a última seja muito variável entre os estudos (Jeffcoate, 1993). As concentrações de FSH estão tipicamente aumentadas nesse período, sendo menores apenas do que os valores observados na onda pré-ovulatória. Já as concentrações médias de LH são menores que em outras fases do ciclo, com pulsos a cada 8-12 horas (Concannon, 2005).

Além dos aspectos clínicos, comportamentais e endócrinos, o *status* reprodutivo da cadela pode ser monitorado pela citologia vaginal seriada (Jeffcoate e Lindsay, 1989). Isso é possível devido à ação do estrógeno no epitélio vaginal, alterando as características das células epiteliais presentes em um esfregaço da mucosa vaginal nas diferentes fases do ciclo estral (Feldman e Nelson, 2004).

No proestro ocorre espessamento da mucosa vaginal e queratinização progressiva das células epiteliais, preparando o aparelho genital feminino para a cópula. Além do aumento percentual de células intermediárias e superficiais no decorrer do proestro, há ainda a presença de hemácias e alguns neutrófilos (Feldman e Nelson, 2004).

O estro é caracterizado por mais de 80% de células superficiais queratinizadas ou cornificadas, proporção que permanece relativamente constante durante todo o período. Entretanto, estudos mostraram que proporções de 80 a 90% de células superficiais podem ocorrer até seis dias antes do pico de LH e até quatro dias depois (Olson, 1989). Por essa razão, a citologia vaginal fornece pouca informação a respeito do pico de LH e o momento da ovulação, sendo necessário acompanhamento citológico, clínico, hormonal e comportamental para avaliação completa dos eventos do ciclo estral canino.

O início do diestro é marcado por uma redução abrupta na quantidade de células superficiais, sendo observado predominância das células parabasais, intermediárias e neutrófilos. O esfregaço vaginal de uma cadela em anestro é semelhante à citologia de diestro (Feldman e Nelson, 2004).

4.2. Mecanismo fisiológico de desencadeamento do proestro

O estímulo para o desencadeamento do proestro em cadelas ainda não está totalmente elucidado. Em espécies poliestrais, a fase folicular é iniciada pouco depois da queda da progesterona causada pela luteólise, e está associada com aumento da liberação de gonadotrofinas. Na espécie canina, entretanto, não há sinais de foliculogênese logo após a retirada da progesterona (Concannon, 1993). A progesterona plasmática permanece em concentrações abaixo de 1,0ng/mL por várias semanas a meses, antes do início do proestro seguinte (Olson et al., 1982).

Comparativamente às extensas informações disponíveis para outras espécies domésticas ou de laboratório, pouco se sabe sobre as características e a regulação da liberação das gonadotrofinas, bem como o controle que elas exercem na atividade ovariana em cães (Concannon, 1993). Embora o controle endócrino do estro, ovulação e função do corpo lúteo esteja bem compreendido (Jeffcoate e Lindsay, 1989), o mecanismo controlando a progressão do anestro para o proestro permanece indefinido (Okkens e Kooistra, 2006).

O término do anestro canino parece estar associado a aumento na secreção de GnRH (Concannon, 1993) ou a aumento da sensibilidade e responsividade da hipófise ao GnRH (Jeffcoate, 1993; Van Haaften et al. 1994; Hoffmann et al. 1996). Van Haaften et al. (1994) mostraram diferentes respostas hipofisárias ao tratamento com GnRH em cadelas em anestro inicial e tardio, com liberação maior de gonadotrofinas no segundo grupo. Verstegen et al. (1999) também observaram a influência do estágio de anestro na resposta à indução farmacológica de estro. Já outro grupo de pesquisadores encontrou respostas de LH similares a tratamentos com um análogo do GnRH em diferentes estágios de anestro (Jeffcoate, 1992).

Em cadelas, os pulsos de GnRH aumentam próximo ao final do anestro e do proestro, sendo correlacionados positivamente com a liberação de LH (Tani et al., 1996). Um estudo utilizando administração de LH exógeno concluiu que o estado de anestro é resultado de secreção insuficiente de LH e que proestro espontâneo provavelmente se deve a aumento da liberação de LH na presença de concentrações adequadas de FSH (Verstegen et al., 1997).

Okkens e Kooistra (2006) sugerem que o final do anestro resulta de uma soma de fatores, sendo caracterizado por maior amplitude e frequência de pulsos de GnRH gerados pelo hipotálamo, aumento na sensibilidade da hipófise ao GnRH e maior responsividade dos ovários às gonadotrofinas.

Tanto o FSH quanto o LH aparentam ser foliculotróficos no cão. A administração de doses farmacológicas de FSH ou LH sozinhos em cadelas em anestro é capaz de promover crescimento folicular e induzir proestro em cadelas (Concannon, 1993; Verstegen et al., 1997). Foi demonstrado que o padrão pulsátil de secreção de LH e FSH observado em outras espécies também ocorre no cão (Jeffcoate, 1993; Hoffmann e Schneider, 1993; Kooistra et al., 1999).

No anestro, as concentrações circulantes de LH são basais e as de FSH geralmente altas (Olson et al., 1982; Concannon, 1993). Durante um curto período antes do início do proestro, observa-se aumento da magnitude e frequência de pulsos de LH, em contraste ao intervalo de três a sete horas normalmente encontrado durante grande parte do anestro (Concannon et al., 1986; Concannon e Temple, 1988; Concannon, 1993), mesmo na ausência de elevação correspondente nos valores de FSH (Olson et al., 1982). Durante o proestro se observa aumento na frequência de LH e FSH, com pulsos ocorrendo a cada 1-2 horas ou menos, estimulando o crescimento da coorte de

folículos, resultando em folículos estrogenicamente ativos (Concannon, 2005).

Um pequeno, mas significativo aumento de estrógeno circulante tem sido observado pouco antes do desencadeamento do proestro, cerca de 30 dias antes do novo ciclo estral (Jeffcoate, 1993) e parece estar relacionado com o restabelecimento da estimulação hipotalâmica (Beijerink et al., 2007). Ainda não está claro como as elevações de LH e estrógeno podem atuar em um mecanismo conjunto de retroalimentação positiva para indução de proestro em cães. Porém, essa teoria é suportada por trabalhos envolvendo o uso isolado de injeções de LH (Verstegen et al., 1997) ou administração de estrógeno sintético em cadelas em anestro (Bouchard et al., 1993), obtendo proestro e estro fértil em estudos previamente realizados. Cain et al. (1988) encontraram concentrações mais baixas de estrógeno imediatamente antes de estro induzido por administrações pulsáteis de GnRH, porém sem afetar o comportamento sexual, cornificação vaginal, número de folículos ovulatórios ou tamanho de ninhada. De maneira semelhante, Concannon (1989) observou que o tratamento com agonistas do GnRH por mais de dez dias resultou em menor liberação de LH durante a onda pré-ovulatória, quando comparado a ciclos normais.

O papel do FSH no desencadeamento do proestro ainda não está claramente demonstrado, uma vez que as suas concentrações se mantêm elevadas durante a maior parte do anestro (Concannon et al., 2006), e declinam no início do proestro, supostamente por retroalimentação negativa exercida pelo estrógeno e pela inibina (Olson et al., 1982). O papel da dopamina também tem sido demonstrado, uma vez que tratamentos com seus agonistas encurtam o período interestral, seja por meio da supressão da prolactina (Verstegen et al., 1999) ou por outro mecanismo, conforme

demonstrado por Okkens e Kooistra (2006) mesmo na presença de concentrações basais de prolactina.

4.3. *Indução de estro em cadelas*

4.3.1. *Indicações para indução de estro*

Nos últimos 10 anos, novas drogas têm sido aplicadas na reprodução canina, sejam elas com fins terapêuticos ou de promover maior controle do ciclo estral e melhoria das taxas de fertilidade e nascimento. Devido à diferente disponibilidade desses compostos nos vários países, a frequência de utilização e os conhecimentos variam entre os clínicos e estudiosos da área (Gobello, 2006).

Dentre as aplicações clínicas ou ainda experimentais de fármacos na reprodução de cães, o controle do ciclo estral na cadela, particularmente a indução de estro, é fundamental para a aplicação de qualquer método de reprodução assistida, seja na pesquisa para preservação de espécies em extinção (Farstad, 2000; Gobello e Corrada, 2003), ou na otimização dos lucros na cinofilia (Concannon, 2005; Kutzler, 2005).

São várias as indicações de indução de estro na cadela. Em cadelas reprodutivamente saudáveis, as indicações se baseiam no interesse em encurtar e sincronizar os ciclos, ajustar o estro ao calendário do proprietário e à disponibilidade de reprodutor ou sêmen, ou aumentar o número e a frequência de ninhadas por cadela (Concannon, 2005). Além do interesse comercial, a avaliação clínica e terapêutica de cadelas em anestro primário ou secundário envolve a indução de estro (Kutzler, 2005). A ausência de protocolos confiáveis de sincronização de ovulação em cadelas é, ainda, o entrave atual nas tentativas de transferência de embriões caninos (Farstad, 2000).

A primeira transferência bem sucedida em cadelas foi relatada há mais de 15 anos,

utilizando cadelas naturalmente sincronizadas dentro de uma colônia (Tsutsui et al., 1989). Desde então ainda não se obteve um protocolo confiável e repetitivo de sincronização de estro em cadelas que permitisse a utilização dessa biotécnica na rotina reprodutiva. Em felídeos, por exemplo, o controle da atividade ovariana está bastante difundido e vem sendo empregado com sucesso, tanto no gato doméstico quanto na conservação de diversas espécies selvagens, atualmente ameaçadas de extinção (Pelican et al., 2006; Pope et al., 2006).

4.3.2. Métodos de indução de estro

Assim como relatado em outras espécies, existem indícios de que abrigar cadelas em anestro junto de fêmeas em proestro ou estro pode encurtar o intervalo entre os ciclos por até mais de 30 dias. Especula-se a participação de feromônios nesse evento. Entretanto, esse fenômeno, conhecido como “efeito dormitório”, em cães é considerado anedótico e controverso pela maioria dos autores (Concannon, 1993; Kutzler, 2007), com resultados inconsistentes e variáveis. Em outras espécies, a bioestimulação pelo efeito macho foi demonstrada (Evans et al., 2004), porém comportamento semelhante não foi descrito em cães.

Desde 1939, mais de 40 protocolos farmacológicos de indução de estro foram testados (Kutzler, 2005). A maioria das drogas, embora amplamente utilizadas em outras espécies, foram pouco estudadas e existem raras formulações especificamente desenvolvidas ou aprovadas para uso em cães (Gobello, 2006). A grande maioria dos protocolos empregados são pouco práticos, muito trabalhosos, caros e muitos deles ainda assumem caráter apenas experimental (Kutzler, 2005), sendo muitos considerados por alguns autores como inapropriados para cadelas ciclando normalmente (Concannon, 2005).

Alguns dos métodos utilizados desde os primeiros estudos até os dias de hoje envolvem:

a) o uso de estrógenos exógenos para promover um *prime* no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano, de modo a induzir um “falso” proestro, seguido por um proestro normal (Moses e Shille, 1988; Bouchard et al., 1993) ou induzir proestro seguido de estro fértil após suplementação com gonadotrofinas (Bouchard et al., 1991a);

b) a administração de gonadotrofinas para induzir um proestro seguido de estro com ovulação espontânea ou induzida por administração adicional de hormônios (Shille et al., 1984; Shille et al., 1989; Verstegen et al., 1997; Wanke et al., 1997);

c) a administração de GnRH (Vanderlip et al., 1987; Cain et al., 1988; Concannon et al., 1997) ou seus agonistas, de modo a provocar liberação endógena de gonadotrofinas e subsequente estro fértil com ovulação espontânea (Concannon, 1989; Inaba et al., 1998; Concannon et al., 2006; Volkmann et al., 2006);

d) a utilização de agonistas dopaminérgicos, que promovem o aparecimento prematuro, porém aparentemente normal, de proestro e estro fértil (Onclin et al., 1993; Jeukenne e Verstegen, 1997; Okkens et al., 1997; Verstegen et al., 1999; Zöldág et al., 2001; Beijerink et al., 2003; Concannon, 2005; Cirit et al., 2006).

Terapias medicamentosas visando indução de estro vêm sendo estudadas, inclusive em canídeos selvagens (Asa et al., 2006). A presente revisão sobre os métodos de indução de estro será focada no uso do GnRH e seus agonistas.

4.4. GnRH e seus análogos

O GnRH, também conhecido como hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), é um decapeptídeo produzido pelo hipotálamo. Locais de

síntese desse hormônio já foram descritos em cães (Kumar et al., 1980), incluindo o hipotálamo mediobasal, o núcleo supraquiasmático e a área pré-óptica.

Sua estrutura química, em quase todos os mamíferos, é pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂. O GnRH é normalmente liberado no sistema porta hipotalâmico-hipofisário de maneira pulsátil e sua meia-vida plasmática é curta, de 2 a 5 minutos, devido a rápida clivagem por proteases (Knobil, 1980; Gobello, 2006).

Ao alcançar a adeno-hipófise, ele se liga a receptores nos gonadotrofos, onde desencadeia liberação pulsátil de gonadotrofinas (Knobil, 1980; Dyer e Robinson, 1989). As gonadotrofinas, por sua vez irão atuar nas gônadas, regulando a síntese de esteróides, a espermatogênese, o desenvolvimento folicular ovariano e a ovulação (Hull e Kenigsberg, 1987). Secreções pulsáteis de GnRH a cada 70 a 90 minutos são necessárias para mediar a produção das gonadotrofinas hipofisárias (Knobil, 1980; Hull e Kenigsberg, 1987).

A administração de GnRH exógeno tem sido aplicada em uma variedade de espécies visando induzir atividade ovariana (Cain et al., 1989). Assim como em outras espécies, o GnRH exógeno promove liberação de LH e FSH por ação direta na hipófise de cães (Concannon, 1993; Kutzler, 2007). As concentrações séricas de FSH e LH elevam-se rapidamente em resposta ao GnRH ou seus análogos. Em cadelas em anestro, a aplicação do agonista lutrelina promove um abrupto e transitório aumento de FSH e LH, que perdura por cerca de dois a três dias (Concannon, 1993).

Diversos estudos demonstraram a necessidade de infusão contínua ou administrações freqüentes de GnRH por cerca de seis a 14 dias para que se tenha uma resposta indicativa de proestro em cadelas tratadas no período de anestro (Vanderlip et

al., 1987; Cain et al., 1989; Concannon et al., 1997; Rota et al., 2003).

Entretanto, após estimulação inicial, a administração prolongada de GnRH ou seus agonistas, promove dessensibilização de seus receptores, resultando em mecanismo de retroalimentação negativo e inibição da liberação de gonadotrofinas (McRae et al., 1985; Vickery et al., 1989; Gobello, 2006). Isso constitui um desafio na utilização dessa classe de medicamentos, pois é necessário ajustar cuidadosamente a dose e duração do tratamento, de modo a se recrutar uma onda folicular competente sem causar supressão posterior da função luteal (Concannon et al., 1997). A regressão precoce dos corpos lúteos tem sido incriminada como uma das principais causas de infertilidade em ciclos estrais ovulatórios induzidos pelos agonistas do GnRH, juntamente com a reparação endometrial incompleta em cadelas com encurtamento acentuado do intervalo interestral (Concannon, 1989; Concannon et al., 1997; Gobello, 2006; Volkmann et al., 2006).

Desde a identificação da molécula do GnRH, mais de 700 análogos, entre agonistas e antagonistas, já foram sintetizados, por meio de alterações moleculares no peptídeo natural. Essas substâncias estão hoje entre as drogas mais estudadas na indução de estro e controle do ciclo estral em cães, atraindo a atenção dos pesquisadores da área (Kutzler, 2007).

Os análogos do GnRH são geralmente produzidos por substituição ou retirada de um ou mais aminoácidos, na busca por maior afinidade aos receptores na hipófise, maior estabilidade e meia-vida prolongada. Todos eles são susceptíveis a degradação das peptidases gastrointestinais, portanto requerem administração parenteral (Kutzler, 2005; Gobello, 2006).

A capacidade da administração pulsátil de GnRH induzir rapidamente proestro

(Vanderlip et al., 1987) condiz com o aumento de pulsatilidade do LH no final do anestro em cadelas normais (Concannon et al., 1986). Doses de 0,2 a 0,4µg/kg de GnRH a intervalos de 90 minutos são suficientes para se obter aumento de LH semelhante a onda observada na transição do proestro para o estro (Concannon, 1993).

Inicialmente, pensava-se que apenas a administração pulsátil de GnRH era capaz de induzir estro (Vanderlip et al., 1987; Cain et al., 1988). Porém, estudos posteriores mostraram a eficácia de infusão contínua, com resultados similares ao dos pulsos de GnRH (Cain et al., 1989).

O modo de administração pulsátil requer dispositivo especializado de infusão, programado para liberar quantidades conhecidas da substância em intervalos determinados de tempo (Cain et al., 1989). A necessidade de cateterização intravenosa, monitorização do paciente e o custo das bombas de infusão tornaram os protocolos impraticáveis na rotina clínica (Cain et al., 1989; Concannon, 1989; Concannon et al., 1997).

Alternativamente à infusão pulsátil, os mecanismos de infusão contínua se dão por meio de bombas osmóticas, implantes subcutâneos ou soluções injetáveis de liberação lenta, tornando mais fácil e aplicável a administração continuada de GnRH e seus agonistas (Cain et al., 1989; Concannon, 1989). A aplicação repetida dessas substâncias em bólus também aparenta levar a bons resultados (Concannon, 1989; Kutzler, 2005). Outros métodos vêm sendo pesquisados, como por exemplo, a utilização de spray intranasal (Hatoya et al., 2006).

Do mesmo modo que pesquisas vêm sendo desenvolvidas em cães, protocolos de indução de estro com análogos do GnRH estão sendo utilizados em canídeos selvagens. Um dos objetivos desse tipo de

tratamento é desenvolver técnicas confiáveis de inseminação em tempo fixo, minimizando as dificuldades da detecção de estro em alguns animais selvagens (Asa et al., 2006).

Dentre os análogos do GnRH já testados em cães, podemos citar a lutrelina (Concannon, 1989; Concannon et al., 2006), azaGlynafarelina (Rubion et al., 2006), buserelina (Rota et al., 2003), leuprolida (Inaba et al., 1998; Hatoya et al., 2006), goserelina (Lombardi et al., 1999) e a deslorelina (Trigg et al., 2001; Sung et al., 2006; Volkmann et al., 2006; Kutzler, 2007). Alguns possuem potência até 200 vezes maior que a molécula natural (Gobello, 2006). No entanto, carecem informações a respeito da sua atividade biológica, dose farmacológica pró-fertilidade, tempo de meia-vida plasmática, entre outras (Concannon et al., 2006).

Devido à supressão hipofisária seguida à administração prolongada dos agonistas do GnRH, estes têm sido utilizados também com objetivo de contracepção. Tem sido demonstrado seu efeito reversível, por longos períodos, tanto em machos como em fêmeas de cães domésticos (Trigg et al., 2001). Devido a sua resposta estimulatória inicial sempre presente antes da regulação negativa, os agonistas do GnRH são recomendados apenas para supressão em longo prazo (Vickery et al., 1989). Praticamente todas as cadelas, a partir da fase puberal, apresentaram proestro no início do tratamento contraceptivo com agonistas do GnRH (Vickery et al., 1989). Atualmente existem duas formulações comerciais de agonistas do GnRH desenvolvidas para contracepção em cães machos (Concannon, 2006).

Implantes subcutâneos administrados em cadelas pré-púberes preveniram reversivelmente a função reprodutiva, sem efeitos colaterais observados (Rubion et al., 2006). Além dos cães, espécies de

carnívoros selvagens vêm sendo objeto de estudo para controle populacional utilizando agonistas do GnRH (Jewgenow et al., 2006).

Nas investigações já realizadas, tanto com agonistas quanto antagonistas, nenhuma alteração foi observada na bioquímica sanguínea ou na hematologia (Tarlantzis e Bili, 2004), embora não haja dados disponíveis em cães. Estudos de Trigg et al. (2006), envolvendo cães machos, não mostraram nenhum efeito colateral do uso de implantes subcutâneos de deslorelina de liberação prolongada por quatro ciclos de seis meses.

Outras indicações do uso de agonistas do GnRH em cães envolvem o tratamento de neoplasias mamárias hormônio-dependentes (Lombardi et al., 1999) e o tratamento de hiperplasia prostática benigna, alternativamente à orquiectomia (Concannon, 2006).

Uma outra classe de análogos do GnRH atualmente estudada é a dos seus antagonistas, que agem por meio de inibição competitiva. Ainda existem poucos dados a respeito do efeito reprodutivo em cães, limitando-se basicamente a supressão de estro, da espermatogênese e interrupção da gestação (Vickery et al., 1989; Gobello, 2006). Porém, essas drogas têm sido amplamente utilizadas em humanos, tanto isoladamente quanto em conjunto com os agonistas do GnRH (Tarlantzis et al., 2006).

4.4.1. *Deslorelina*

A deslorelina é um peptídeo sintético D-Trp⁶-Pro⁹-des-Gly¹⁰ análogo do GnRH, com duas substituições de aminoácidos (Kutzler, 2007). Essa droga tem sido amplamente utilizada no controle reprodutivo das espécies domésticas, principalmente na indução de ovulação de éguas em estro (Squires et al., 1994). A potência biológica da deslorelina é cerca de 150 vezes maior

que a do GnRH, além dela apresentar maior estabilidade (Concannon, 2005).

Primeiramente foi desenvolvido e testado um implante subcutâneo, biocompatível e biodegradável, de liberação controlada em dois a três dias, contendo 2,1mg de acetato de deslorelina (Ovuplant®, Fort Dodge Animal Health, EUA), disponível comercialmente nos Estados Unidos desde 1999 e desde então difundido em diversos países (Stitch et al., 2004). Estudos demonstraram a eficiência do Ovuplant® na indução de ovulação em até 48 horas, em éguas em estro apresentando folículos ovarianos com mais de 30mm de diâmetro (Jöchle e Trigg, 1994; Squires et al., 1994). Uma desvantagem potencial do uso desses implantes é a necessidade de retirada dos mesmos após confirmada a ovulação, pois a sua permanência resulta em supressão do crescimento folicular e maior intervalo interestrual em éguas que falharem na concepção. Esse atraso pode variar de três até mais de 30 dias (McCue et al., 2002; Stitch et al., 2004).

Burns et al. (1997), citados por Berezowski et al. (2004), demonstraram a eficácia de uma formulação líquida biocompatível de liberação de deslorelina em curto prazo, na concentração de 1,5mg/mL (BioRelease® Deslorelin, BET Pharm, EUA), recentemente desenvolvida, disponível na forma de injeções intramusculares. A eficácia dessa formulação na indução de ovulação em éguas é similar à observada para o implante subcutâneo de deslorelina, porém sem os efeitos supressivos de regulação negativa sobre as gonadotrofinas hipofisárias, devido a sua ação menos prolongada (Stitch et al., 2004). Pelo fato de ser um peptídeo não imunogênico, a deslorelina pode ser utilizada em estros consecutivos em um mesmo indivíduo, sem a ocorrência de refratariedade observada em compostos como o hCG (Wilhelm et al., 1994) e com a mesma eficácia (Berezowski et al., 2004).

Em rebanhos leiteiros de bovinos, diferentes estudos têm envolvido a deslorelina. Entre eles podemos citar investigações sobre o controle do retorno à ciclicidade no período pós-parto (Padula e Macmillan, 2002), a redução da perda gestacional no período embrionário tardio (Bartolome et al., 2005) e protocolos de inseminação em tempo fixo (Santos et al., 2004).

Em cães, a primeira aplicação clínica da deslorelina foi como contraceptivo. Trigg et al. (2001) publicaram os dados de estudos clínicos com um implante de deslorelina, hoje comercialmente disponível e registrado na Austrália e na Nova Zelândia para contracepção em cães machos (Suprelorin®, Peptech Animal Health, Austrália). Os implantes lipídicos são aplicados por via subcutânea e liberam quantidades mínimas do princípio ativo em padrão bem definido, inibindo temporária e reversivelmente a produção de gonadotrofinas e hormônios sexuais, por cerca de seis a doze meses (Trigg et al., 2001; Wright et al., 2001).

Nas investigações com deslorelina envolvendo contracepção de fêmeas notou-se que todas as cadelas peri ou pós-púberes tratadas inicialmente apresentavam proestro e estro, seguidos de supressão prolongada do ciclo estral (Trigg et al., 2001; Wright et al., 2001; Trigg et al., 2006). Com base nessa observação, Kutzler et al. (2002) e Volkmann et al. (2006) publicaram trabalhos nos quais avaliaram o uso do Ovuplant® por via submucosa (mucosa vulvar), utilizando, respectivamente, cadelas em anestro e fêmeas em diestro previamente tratadas com prostaglandina, obtendo sucesso na indução de estro com a colocação de um único implante. Os implantes subcutâneos de deslorelina atualmente disponíveis fornecem doses aproximadas de 4 a 8µg/kg/dia em cães de médio porte, baseando-se em informações técnicas do fabricante (Concannon, 2006). Com esse tipo de tratamento em cadelas em anestro, tem-se obtido sinais de proestro após sete a dez dias

após colocação do implante (Sung et al., 2006).

Alternativamente ao uso de implantes, estudos com a formulação injetável de liberação em curto período de tempo têm sido desenvolvidos nesses últimos três anos. Resultados preliminares divulgados por Kutzler (2005) mostraram que três cadelas apresentaram proestro em três a cinco dias, ovulação e gestação normais após aplicação intramuscular de 1,5mg de deslorelina em dose única. Apesar desse resultado inicialmente apresentado, experimento subsequente do mesmo laboratório foi incapaz de induzir estro em oito cadelas tratadas com a mesma formulação e mesma dosagem, adotando os parâmetros de citologia vaginal e concentração de progesterona plasmática (Kutzler et al., 2006). Nesse mesmo trabalho, foi determinada a concentração sérica de deslorelina, que se manteve elevada por um a três dias após a aplicação do produto, sugerindo que o período de estimulação foi insuficiente para induzir resposta hipofisária e ovariana adequada para indução de estro fértil (Concannon et al., 1997). Ainda no mesmo centro de pesquisa, Kutzler (2007) testou a utilização de uma, duas ou três aplicações intramusculares com intervalos de 48 horas. Na avaliação citológica e hormonal, nenhuma das cadelas apresentou sinais de estro. As concentrações de deslorelina foram determinadas e houve grande variação entre os animais, permanecendo elevadas por cerca de 10 dias apenas em dois indivíduos tratados com três injeções (Kutzler, 2007).

Tendo em vista os resultados promissores dos agonistas do GnRH na indução de estro fértil em cadelas e visando estudar a fisiologia reprodutiva canina, bem como investigar resultados inconsistentes de estudos prévios com uma formulação intramuscular de deslorelina, foi desenvolvido estudo comparando os efeitos de aplicação intramuscular única de

deslorelina e a utilização de quatro injeções em dias alternados sobre o aparelho genital de cadelas em anestro. Com isso, espera-se

verificar se a deslorelina é capaz de induzir estro em cadelas e descrever os eventos resultantes desse tratamento.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizadas 13 cadelas adultas, sem raça definida, pesando entre 10 e 15kg, com idade estimada entre 2 e 7 anos, clinicamente saudáveis, provenientes do Serviço de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte - MG. Todas as cadelas foram inicialmente avaliadas por citologia vaginal e dosagem plasmática de progesterona, sendo caracterizadas em anestro clínico pela predominância de células parabasais, intermediárias e raros neutrófilos, concentração plasmática de progesterona menor que 0,5ng/mL e ausência de sinais clínicos de proestro. Um cão macho foi utilizado do início do experimento até a caracterização citológica de diestro para avaliação do comportamento sexual das fêmeas. Os animais foram mantidos em canis individuais, com dimensões de 2,5m de comprimento x 1,5m de largura x 1,4m de altura. Os cães foram alimentados com ração comercial balanceada¹ oferecida uma vez ao dia e água *ad libitum*. Foi respeitado um período mínimo de 15 dias antes do início do experimento para adaptação dos animais ao ambiente e manejo, bem como observação de quaisquer sinais de doença ou impedimentos à utilização dos mesmos. Nesse período os animais foram higienizados, vermifugados² e tratados com ectoparasiticida³.

5.2. Grupos experimentais e tratamento com deslorelina

Treze cadelas foram aleatoriamente divididas em três grupos. No Grupo 1, cinco

cadelas receberam uma única aplicação de 2,0mg de deslorelina⁴, por via intramuscular. O Grupo 2 foi constituído por cinco cadelas, que receberam quatro aplicações intramusculares de 2,0mg de deslorelina com intervalos de 48 horas. Os frascos estéreis contendo a solução de deslorelina foram armazenados sob refrigeração entre 2 e 8°C e seu conteúdo homogeneizado cuidadosamente antes de cada aplicação. O Grupo Controle foi representado por três animais, mantidos no mesmo local dos demais, com contato visual constante, e acompanhados desde o dia 0 até o final do experimento. As cadelas do Grupo Controle receberam quatro injeções intramusculares contendo 2,0mL de solução salina 0,9% em dias alternados. O dia 0 foi definido como o dia da primeira aplicação de deslorelina em cada animal. Os locais de administração da droga e da solução salina controle foram avaliados diariamente quanto à presença de aumento de volume, dor ou quaisquer outras alterações.

O delineamento do presente experimento e as condições de realização do mesmo foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFGM), tendo sido aprovado e considerado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal (Anexo 1).

5.3. Avaliação clínica e comportamento sexual

As cadelas foram avaliadas diariamente quanto à presença de edema e corrimento vulvar serosanguinolento, bem como parâmetros gerais como atitude e apetite. O comportamento sexual foi avaliado quanto à atração e receptividade ao macho, colocado

¹ Kanina - Purina

² Drontal Plus - Bayer Saúde Animal

³ Cydectin - Bayer Saúde Animal

⁴ Deslorelin 1,0mg/mL - BetLabs

diariamente junto de cada cadela por cinco minutos, até a caracterização citológica de diestro.

5.4. Citologia vaginal

Esfregaços vaginais para exame citológico foram obtidos com uso de *swabs* estéreis umedecidos com solução fisiológica estéril, gentilmente friccionados contra o epitélio dorsal da cavidade vaginal e depois rolados sobre a superfície de lâminas de microscopia, secados ao ar, fixados em álcool 70% e corados pelo método de hematoxilina-Shorr (Anexo 2). Esfregaços foram obtidos diariamente desde o dia anterior ao início dos tratamentos até a obtenção de três esfregaços consecutivos sugestivos de diestro; e depois obtidos a cada três dias até o final do experimento. No exame citológico foi avaliada a proporção de células parabasais, intermediárias e superficiais, bem como a presença de hemácias e neutrófilos, com microscopia de luz, utilizando aumento de 200x ou 400x.

5.5. Concentração plasmática de progesterona

Amostras de sangue foram coletadas diariamente do dia anterior ao início dos tratamentos até a caracterização citológica de diestro. Em seguida, coletas foram feitas a cada três dias até o final do experimento. As amostras foram coletadas sempre no período da manhã, por punção da veia jugular, em tubos vacutainer heparinizados de 10,0ml e cuidadosamente homogeneizados. Após centrifugação a 700 x g por 5min, o plasma foi colhido e armazenado a -20°C para posterior análise. A concentração plasmática de progesterona foi determinada por radioimunoensaio, utilizando reagentes comerciais Coat-a-

Count⁵, conforme England e Verstegen (1996).

5.6. Ovariohisterectomia

Ovariohisterectomia foi realizada no 25º dia de diestro nas cadelas que apresentaram estro. As demais cadelas foram submetidas ao procedimento 45 dias após o início do experimento. No pré-operatório, as cadelas foram submetidas a jejum hídrico e alimentar de 12 horas. O procedimento foi realizado conforme técnica descrita por Stone (2002), utilizando-se protocolo anestésico com cloridrato de xilazina 2% na dose de 2,0mg/kg, por via intramuscular, tiopental sódico 2,5% na dose inicial de 12,5mg/kg, por via intravenosa, e manutenção de acesso venoso para novas administrações de manutenção de plano anestésico. No pós-operatório imediato as cadelas foram medicadas com cetoprofeno 10% na dose diária de 1,0mg/kg, por via intramuscular, durante três dias.

5.6.1. Avaliação macroscópica, colheita e preservação de útero e ovários

Após a ovariohisterectomia, útero e ovários foram separados, pesados em balança analítica digital e mensurados quanto ao diâmetro e comprimento dos mesmos. Os ovários foram inspecionados quanto à presença de folículos e corpos lúteos, visando confirmar a ocorrência de ovulação e verificar eventuais falhas de ovulação, sendo registrado o número de estruturas por cadela e por ovário. Após avaliação macroscópica, seções completas de aproximadamente 5mm de espessura da porção média dos cornos uterinos e fragmentos do parênquima ovariano foram coletados e fixados em formol a 10% para processamento histológico posterior. As amostras encontram-se armazenadas no

⁵ Kit de progesterona Coat-a-Count – DPC MEdLab

Laboratório de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

5.7. Delineamento experimental e análise dos dados

Os animais foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos, em um delineamento experimental inteiramente casualizado. Com o objetivo de traçar o

perfil citológico e hormonal das diferentes fases do ciclo estral de cadelas em anestro tratadas com a deslorelina foi utilizada estatística descritiva e traçados gráficos para descrever os diferentes perfis. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. Diferenças entre ou dentro dos grupos foram determinadas pelo teste t de Student ao nível de significância de 5% (Sampaio, 2002).

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação clínica, comportamento sexual e citologia vaginal

Ao início do experimento, todos os cães apresentavam citologia vaginal com predominância de células parabasais, intermediárias pequenas e raros neutrófilos, sendo o estágio de anestro confirmado pela dosagem de progesterona plasmática abaixo de 0,5ng/mL.

No Grupo 1, nenhuma das cadelas tratadas com injeção única de deslorelina (0/5) apresentou sinais compatíveis com estro. Em dois dos animais, foram observados corrimento vulvar serosanguinolento e edema vulvar transitórios 3 a 6 dias após a aplicação (média, 4,5±2,1 dias), que persistiram por 3 a 4 dias (média, 3,5±0,7 dias). Três das cadelas (3/5) atraíram o macho quando desafiadas, porém sem aceitação de cortejo ou cópula.

Na citologia vaginal, todas as cadelas (5/5, 100%) apresentaram aumento da proporção de células superficiais, atingindo pico médio de 44±15,2% deste tipo celular. As duas cadelas que mostraram sinais clínicos de proestro alcançaram mais de 50% de células superficiais, antes de um rápido declínio da proporção e predominância de células parabasais e neutrófilos, compatível com diestro ou anestro. A porcentagem média de células superficiais entre os dias 3 e 8 pós-tratamento foi maior nas cadelas com sinais clínicos de proestro ($P < 0,05$). O dia do esfregaço com menos de 20% de células superficiais coincidiu com o dia de desaparecimento do corrimento vaginal e do edema de vulva.

Já nas cadelas do Grupo 2, tratadas com injeções múltiplas seriadas de deslorelina, 4/5 indivíduos (80%) exibiram sinais característicos de proestro e estro, incluindo descarga vulvar serosanguinolenta, edema vulvar, aceitação do macho e aumento do

número de células superficiais no esfregaço vaginal.

Os sinais de proestro nas cadelas do Grupo 2 responsivas ao tratamento foram primeiramente observados 4 a 6 dias após o início do tratamento (média, 5,0±0,8 dias). A duração média do proestro foi de 8,3±1,0 dias. A transição do proestro para o estro foi definida como o primeiro dia em que se encontrou mais de 80% de células superficiais na citologia vaginal, coincidindo em todos os casos com edema vulvar, na presença ou não de corrimento vaginal e/ou aceitação ao macho. Nem todas as cadelas apresentaram reflexo postural positivo ao macho durante todo o estro, variando de 2 a 6 dias de aceitação (média, 3,0±2,2 dias).

Nas cadelas que responderam às injeções seriadas de deslorelina, o intervalo entre o início do tratamento e o aparecimento do estro variou de 12 a 15 dias (média, 13,3±1,5). A mudança abrupta para esfregaço vaginal típico de diestro ocorreu 19,3±1,5 dias após a primeira aplicação da deslorelina.

Um animal do Grupo 2 (1/5, 20%) apresentou corrimento vaginal sanguinolento, edema vulvar e atração do macho, porém falhou em alcançar mais de 80% de células superficiais no esfregaço vaginal. Ao atingir 65%, ela rapidamente voltou a apresentar pequena porcentagem de células superficiais. O aparecimento do proestro ocorreu oito dias após o início do tratamento e durou apenas quatro dias, quando então cessaram os sinais. A Tabela 1 ilustra as respostas obtidas nos dois grupos e o tempo decorrido até o aparecimento dos eventos nos animais que responderam aos tratamentos.

Tabela 1 – Incidência da resposta reprodutiva em cadelas, nos diferentes grupos, e o tempo decorrido, em dias, até o aparecimento dos eventos, expresso em média \pm desvio-padrão

Respostas	Grupo 1 (n=5)	Grupo 2 (n=5)	Grupo Controle (n=3)
Proestro	4,5 \pm 2,1 (2/5)	5,6 \pm 1,5 (5/5)	35 (1/3)
Estro	-	13,3 \pm 1,5 (4/5)	-
Ovulação	-	16 \pm 2 (3/5)	-
Diestro	-	19,3 \pm 1,5 (3/5)	-

No Grupo Controle, uma das cadelas abrigadas junto das tratadas apresentou sinais de proestro 35 dias após o início do experimento. As outras duas mantiverem esfregaços vaginais, sinais clínicos e comportamento sexual compatíveis com anestro durante todo o período de realização do trabalho.

Uma cadela do Grupo 1 e duas do Grupo 2 apresentaram dor e edema leve no local de aplicação da deslorelina, nos músculos semitendinoso ou semimembranoso. Uma destas apresentou claudicação discreta por dois dias. Não foi utilizado nenhum tipo de tratamento local ou sistêmico. Nenhuma alteração de disposição ou apetite foi notada.

6.2. Concentração plasmática de progesterona

A concentração plasmática de progesterona encontrava-se abaixo de 0,5ng/mL em todos os cães imediatamente antes de iniciado o experimento. As curvas obtidas de cada uma das cadelas tratadas são mostradas nas figuras 1 a 10.

Nos animais do Grupo 1, observou-se elevação discreta da progesterona plasmática nos primeiros dias após a aplicação de deslorelina. Tanto nos três animais desse grupo que não apresentaram sequer proestro, quanto nos outros dois, que mostraram sinais clínicos, os valores permaneceram abaixo de 1,0ng/mL subsequente ao tratamento e durante todo o experimento.

A concentração média de progesterona, entre os dias três e seis após a aplicação de deslorelina, foi maior nos animais que exibiram proestro do que nos demais ($P < 0,05$). Após o dia 15, todos os cães do Grupo 1 apresentavam concentrações basais de progesterona, iguais ou menores que 0,1ng/mL. Após retornar a valores basais, a concentração de progesterona permaneceu em valores não detectáveis (menores do que 0,1ng/mL) em grande parte do tempo, com oscilações discretas ocorrendo nesse período.

No Grupo 2, quatro cadelas (4/5, 80%) apresentaram valores de progesterona acima de 1,0ng/mL, dois a três dias antes dos primeiros sinais clínicos de estro, diferente do observado no Grupo 1 ($P < 0,05$). Três cadelas ovularam (3/5, 60%), conforme indicado por valores de progesterona acima de 10,0ng/mL e elevação posterior até o diestro. Esses mesmo animais foram capazes de manter concentração de progesterona próxima ou acima de 15,0ng/mL até o vigésimo quinto dia de diestro, diferindo daqueles que não apresentaram estro ($P < 0,05$), quando então foram submetidas a ovariectomia. O pico de concentração de progesterona alcançado pelas cadelas foi de 23,8 \pm 2,1.

O dia da ovulação foi estimado como o primeiro dia em que a progesterona plasmática ultrapassou o valor de 4,0ng/mL. A ovulação nas três cadelas do Grupo 2 ocorreu no segundo ou terceiro dia do estro induzido, 16 ± 2 dias após a primeira das quatro injeções de deslorelina.

Uma das cadelas apresentou sinais clínicos, citologia vaginal e comportamento sexual similares às demais cadelas responsivas, porém não ovulou durante o estro. A concentração de progesterona aumentou até 2,1ng/mL, 12 dias após o início do tratamento, semelhantemente ao observado nos três animais que ovularam ($P > 0,05$), quando então voltou a diminuir, retornando a valores basais após 6 dias.

Uma cadela do Grupo 2 apresentou sinais de proestro, porém foi incapaz de entrar em estro. As concentrações de progesterona desse animal não ultrapassaram 1,0ng/mL em nenhum momento, resultando em término do proestro. A média das concentrações de progesterona dessa cadela não diferiu daquelas do Grupo 1 que apresentaram sinais de proestro, porém foram diferentes das cadelas que apresentaram estro após o tratamento ($P < 0,05$).

As três cadelas do Grupo Controle mantiveram concentrações de progesterona próximas ou abaixo de 0,1ng/mL até o dia 35 do experimento, diferente do observado nos indivíduos dos Grupos 1 e 2 ($P < 0,05$). Daí em diante, duas cadelas continuaram com valores basais de progesterona, enquanto uma delas apresentou elevação lenta e progressiva até o final do experimento, alcançando 1,3ng/mL no dia 45 (última

dosagem incluída nos dados experimentais), sendo a curva de progesterona, os sinais clínicos e citológicos compatíveis com proestro.

6.3. Avaliação macroscópica de útero e ovários

As cadelas que não mostraram sinais clínicos e citológicos de estro foram submetidas à ovariectomia no dia 45 do experimento. Já as quatro cadelas que exibiram estro foram submetidas à ovariectomia 25 dias após o final do estro, entre 43 e 46 dias após o início do tratamento. Todos os animais possuíam útero e ovários sem sinais macroscópicos de patologias.

Nenhuma diferença foi observada no tamanho do útero entre os grupos ($P > 0,05$). O diâmetro médio dos cornos uterinos foi de $7,0 \pm 0,8$ mm; $7,4 \pm 0,6$ mm e $6,9 \pm 0,7$ mm; nos Grupos 1, 2 e Controle, respectivamente. O comprimento médio dos cornos uterinos foi de $9,0 \pm 1,3$ cm; $9,3 \pm 1,6$ cm; e $8,7 \pm 1,5$ cm, respectivamente nos Grupos 1, 2 e Controle.

A ovulação nas três cadelas do Grupo 2 foi confirmada pela presença de corpos lúteos no 25º dia de diestro, identificados como estruturas brilhantes, de coloração rosa-salmão na superfície dos ovários (Figura 11), durante a ovariectomia. Foi encontrado um total de 14 corpos lúteos, com média de $4,7 \pm 1,2$ por cadela e $2,3 \pm 1,0$ por ovário.

O peso dos ovários foi significativamente maior nas cadelas do Grupo 2 que ovularam ($P < 0,05$), $2,8 \pm 0,7$ g *versus* $1,2 \pm 0,5$ g nas demais.

Nenhuma das cadelas estudadas possuía corpos lúteos e folicúlos simultaneamente no momento da ovariectomia.

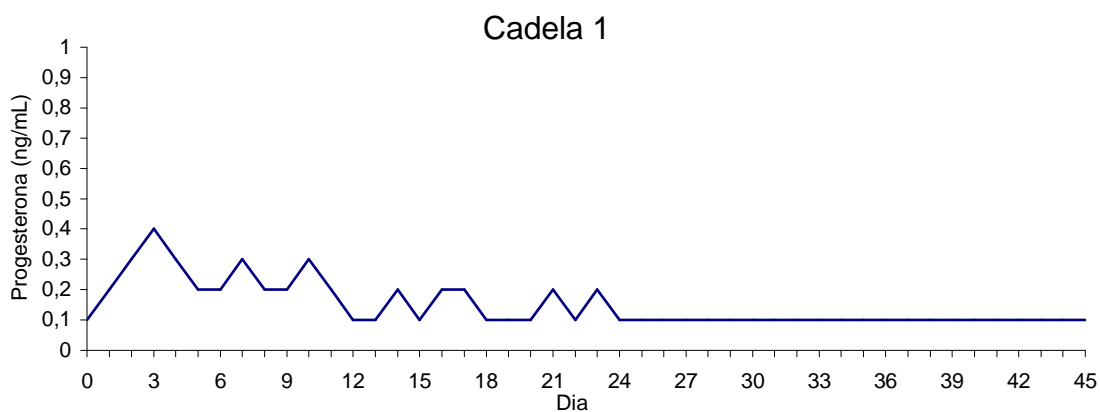


Figura 1 – Concentração plasmática de progesterona da Cadela 1, tratada com dose única de deslorelina, sem manifestação de proestro.

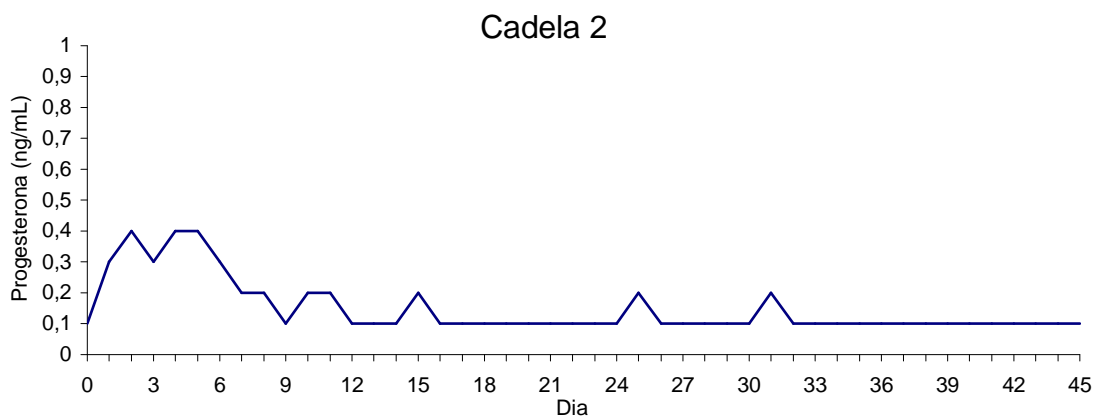


Figura 2 – Concentração plasmática de progesterona da Cadela 2, tratada com dose única de deslorelina, sem manifestação de proestro.

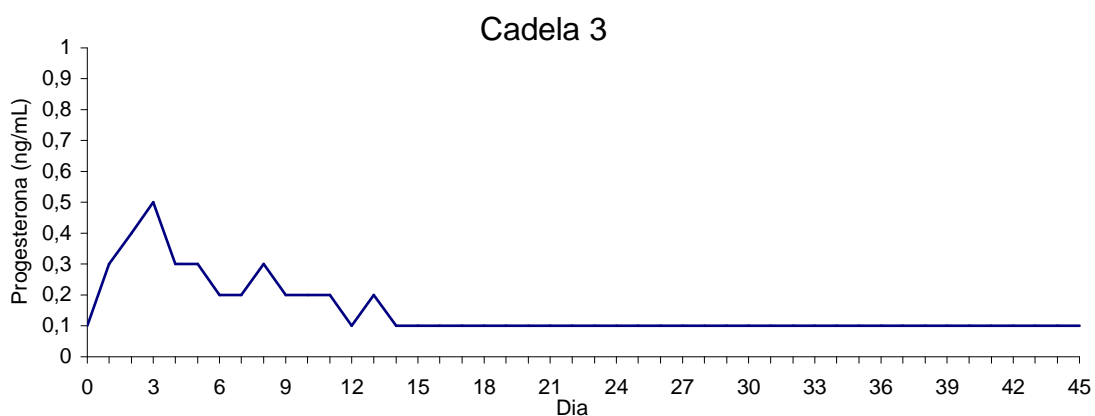


Figura 3 – Concentração plasmática de progesterona da Cadela 3, tratada com dose única de deslorelina, sem manifestação de proestro.

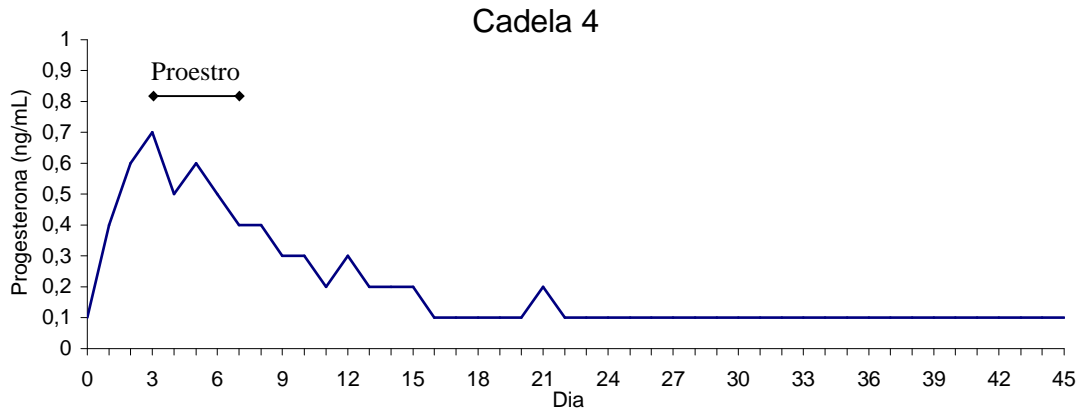


Figura 4 – Concentração plasmática de progesterona da Cadela 4, tratada com dose única de deslorelina, com manifestação de proestro.

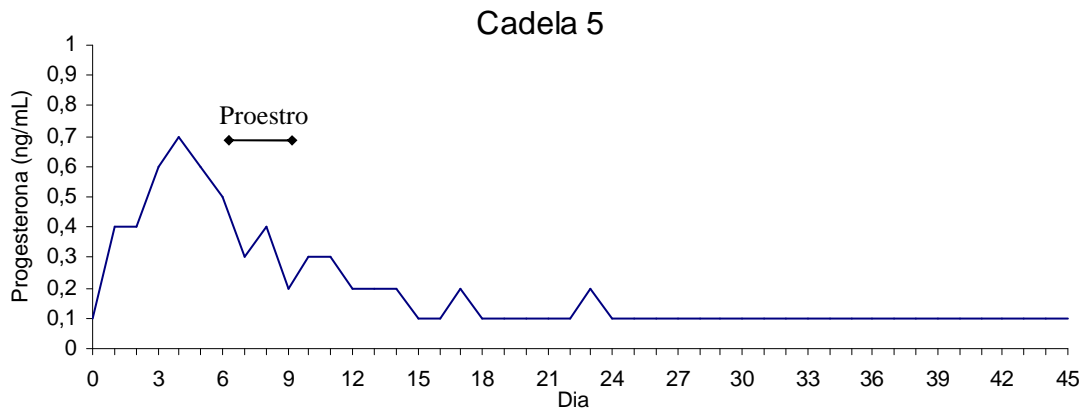


Figura 5 – Concentração plasmática de progesterona da Cadela 5, tratada com dose única de deslorelina, com manifestação de proestro.

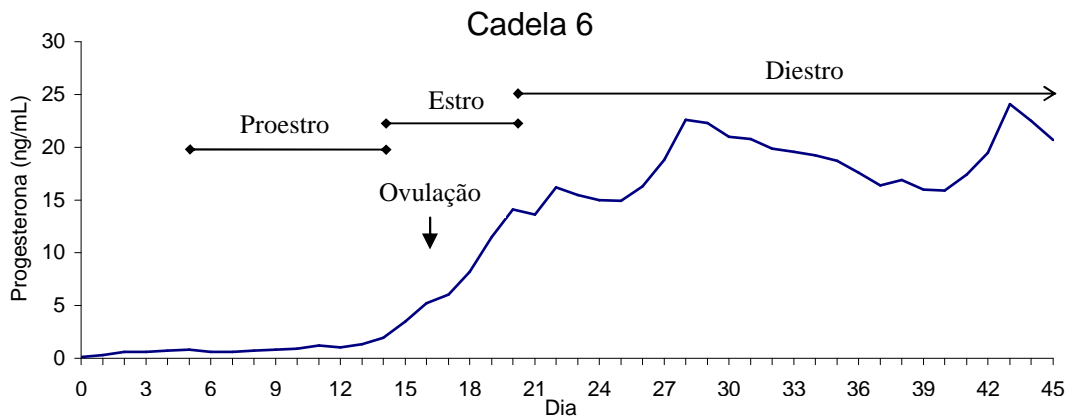


Figura 6 – Concentração plasmática de progesterona da Cadela 6, tratada com múltiplas injeções de deslorelina, com manifestação de proestro, estro, ovulação e fase luteal.

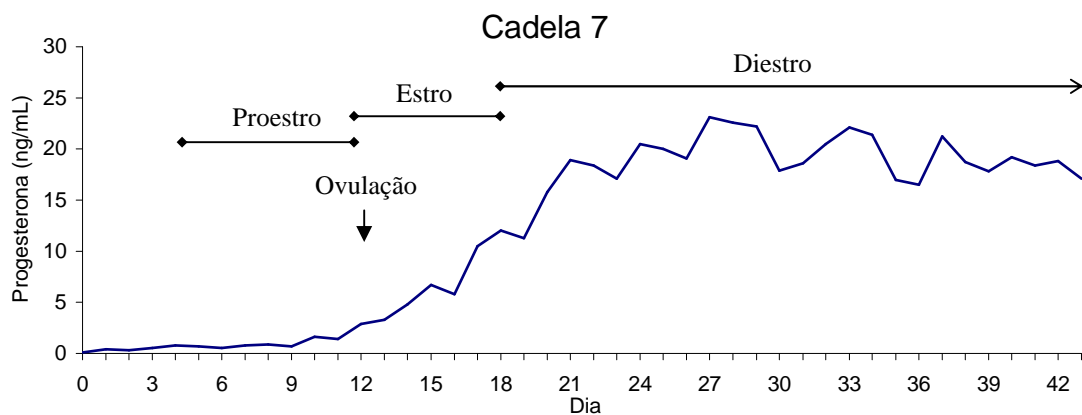


Figura 7 – Concentração plasmática de progesterona da Cadela 7, tratada com múltiplas injeções de deslorelina, com manifestação de proestro, estro, ovulação e fase luteal.

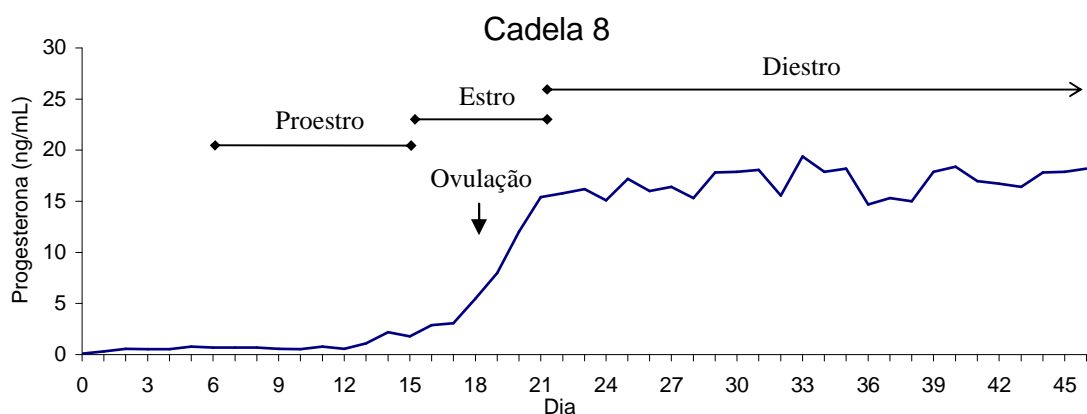


Figura 8 – Concentração plasmática de progesterona da Cadela 8, tratada com múltiplas injeções de deslorelina, com manifestação de proestro, estro, ovulação e fase luteal.

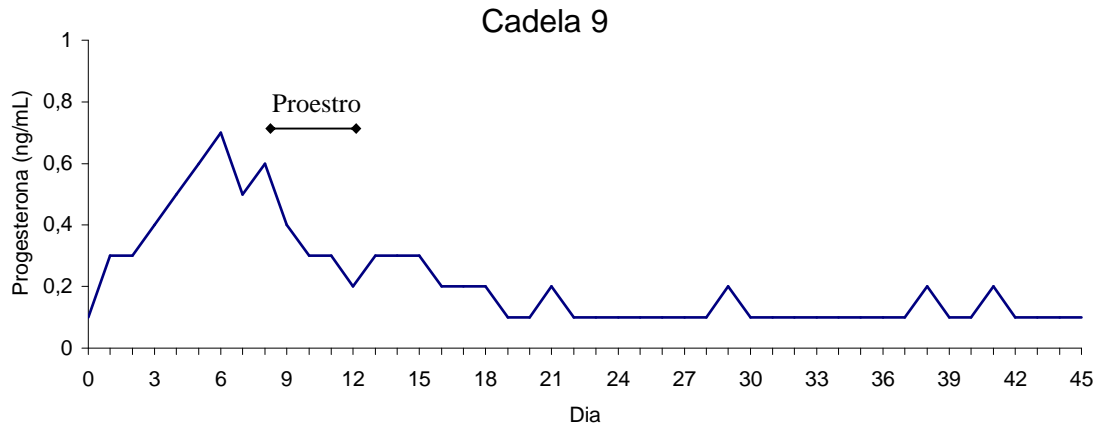


Figura 9 – Concentração plasmática de progesterona da Cadela 9, tratada com múltiplas injeções de deslorelina, com manifestação de proestro.

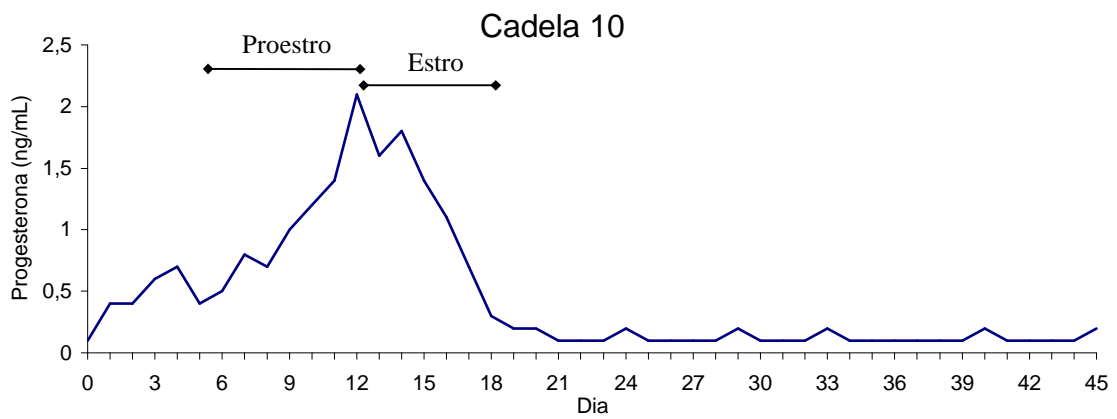


Figura 10 – Concentração plasmática de progesterona da Cadela 10, tratada com múltiplas injeções de deslorelina, com manifestação de proestro e estro anovulatório.

7. DISCUSSÃO

A duração do estágio de anestro dos cães utilizados no presente trabalho não foi caracterizado, pois o ciclo estral anterior era desconhecido. Com isso, não foi possível afirmar o real efeito da administração de deslorelina sobre a indução de estro e a redução do intervalo interestral, bem como o efeito do momento do anestro sobre a resposta ao tratamento, fato esse descrito em estudos prévios (Van Haaften et al., 1994; Verstegen et al., 1999). Porém, têm-se no presente trabalho evidências de que a deslorelina foi capaz de induzir proestro, estro e ovulação, quando administrada seriadamente.

Dos animais submetidos a esse tratamento (Grupo 2), três apresentaram proestro, estro, ovulação e formação de corpos lúteos semelhante ao descrito em ciclos estrais espontâneos (Concannon et al., 1975; Feldman e Nelson, 2004) e ciclos induzidos por agonistas do GnRH (Cain et al., 1989; Concannon et al., 1997). A porcentagem de sucesso no tratamento atual (60%) é tão animadora quanto tratamentos anteriores (Concannon, 1989; Concannon et al., 1997; Verstegen et al., 1997), levando em consideração o desconhecimento do estágio de anestro ou histórico reprodutivo prévio das cadelas utilizadas (Volkman et al., 2006).

O dia da ovulação foi assumido como o primeiro dia em que a concentração de progesterona ultrapassou 4,0ng/mL (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004). A ovulação presumivelmente ocorreu no segundo ou terceiro dia de estro, concordando com o

observado por Phemister et al. (1973) e De Gier et al. (2006), entre 14 e 18 dias do início do tratamento (média, 16 ± 2), ocorrendo pequena variação, que pode estar relacionada a diferença de absorção e distribuição da droga nos animais (Kutzler, 2007) ou variação individual de reposta endócrina e fisiológica. A pequena variação entre o dia da ovulação nos três animais, em relação ao início do tratamento, desperta o interesse da utilização dessa forma de aplicação da deslorelina em programas de sincronização de estro para transferência de embriões.

O maior peso dos ovários retirados das cadelas do Grupo 2 que ovularam se deve à contribuição dos corpos lúteos (Ström Holst et al., 2001). O pequeno número de corpos lúteos por cadela ($4,7\pm 1,2$) foi observado também em ciclos induzidos por implantes de deslorelina (Volkman et al., 2006). O pico de progesterona observado no diestro das cadelas responsivas ao tratamento é semelhante ao observado por Cain et al. (1988), porém ligeiramente menor do que o encontrado por Concannon et al. (1975) na primeira metade do diestro.

O diâmetro e o comprimento dos cornos uterinos não variaram entre os grupos, resultado este semelhante a outros trabalhos comparando o útero no anestro, diestro gestacional e diestro não gestacional (England et al., 2003). Avaliação microscópica se faz necessária para verificar eventuais mudanças promovidas pela deslorelina

no endométrio das cadelas que apresentaram diestro.

O motivo pelo qual um dos animais do Grupo 2 não apresentou estro segue indeterminado, porém, especula-se que esta cadela poderia ter recentemente alcançado valores basais de progesterona, encontrando-se em estágio muito inicial de anestro e apresentando estoques inadequados de LH na hipófise (Fernandes et al., 1987), incapazes de desencadear desenvolvimento folicular. Outra hipótese, suportada por alguns autores, seria a baixa sensibilidade e responsividade da hipófise no momento da estimulação pelo agonista do GnRH (Concannon et al., 1997), assim como ocorre em momentos intermediários do período de anestro de cadelas (Okkens e Kooistra, 2006).

De modo semelhante, não é possível determinar a razão da falha de ovulação de uma das cadelas do Grupo 2, apesar da mesma apresentar sinais de estro semelhantes aos das cadelas que responderam com estro ovulatório. O mesmo já foi descrito em tratamentos com LH (Concannon, 1989; Verstegen et al., 1997), GnRH (Cain et al., 1989; Concannon et al., 1997) ou agonistas do GnRH (Volkman et al., 2006).

O aumento inicial da progesterona e queda subsequente no decorrer do estro sugerem que a onda de LH foi insatisfatória ou ausente, incapaz de promover a ovulação dos folículos inicialmente recrutados. Esse fenômeno, nomeado por alguns autores como falso estro, já foi relatado em falhas espontâneas de ovulação e parece não estar relacionado com estrógeno circulante, visto que a citologia vaginal e

o comportamento sexual permaneceram inalterados (Concannon et al., 1997)

Todas as cadelas do Grupo 1 apresentaram elevação discreta, porém detectável de progesterona, e duas chegaram a exibir sinais clínicos de proestro. Entretanto, nenhuma delas exibiu sinais de estro, sendo a aplicação única de deslorelina considerada ineficaz na indução de estro em cadelas em anestro. Esse resultado está de acordo com o observado em estudos previamente realizados, que demonstraram a necessidade de estimulação do GnRH por períodos de 7 a 15 dias, para que se obtenha resposta hipofisária e ovariana consistente (Vanderlip et al., 1987; Concannon, 1989; Concannon et al., 1997; Kutzler, 2007).

Os sinais clínicos, citológicos e comportamentais de proestro transitório apresentados por duas cadelas do Grupo 1, provavelmente se devem a luteinização de folículos e síntese inicial de progesterona, resultando em maior liberação de gonadotrofinas, embora em concentrações ainda insatisfatórias.

Aplicações únicas ou seriadas de deslorelina recentemente testadas não foram eficazes na indução de estro canino (Kutzler, 2007), apesar de resultados preliminares mostrarem sucesso na utilização de dose única de deslorelina (Kutzler, 2005). Kutzler (2007) testou, sem sucesso, uma, duas e três aplicações contendo 1,5mg de deslorelina, por via intramuscular, em dias alternados. Especula-se, com os resultados do presente trabalho, que a possível causa dos resultados

inconsistentes de Kutzler (2007) teria sido a estimulação insuficiente da hipófise, tanto pela dose quanto pela duração do tratamento.

Durante o presente experimento, não foi verificado “efeito dormitório” ou bioestimulação entre as fêmeas que apresentaram proestro e estro e aquelas do Grupo Controle. Apenas um indivíduo do Grupo Controle desenvolveu sinais de proestro na segunda metade do trabalho, na ausência de um fenômeno de sincronização natural de estro e, possivelmente, sem qualquer relação com a ciclicidade das demais cadelas.

Nenhum efeito colateral significativo foi relacionado com a deslorelina. A única

reação adversa observada, em três cadelas, foi dor e edema leve no sítio de aplicação intramuscular. Desses animais, dois receberam quatro injeções seriadas, sendo duas em cada membro pélvico, nos músculos semitendinoso ou semimembranoso. Os sinais desapareceram no prazo de dois dias em todos os casos, sem necessidade de nenhum tipo de tratamento local ou sistêmico. Todos os cães mantiveram apetite, ingestão de água e disposição normais durante todo o período decorrido. Portanto, a formulação líquida de deslorelina utilizada mostrou-se segura no experimento realizado, em conformidade com estudos avaliando a segurança dos agonistas do GnRH (Tarlatis e Bili, 2004).

8. CONCLUSÕES

- a) A formulação injetável de 2,0mg de deslorelina se mostrou eficaz na indução de estro em cadelas em anestro, quando administrada em dias alternados, por via intramuscular, em um total de quatro aplicações.
- b) O estro induzido pela deslorelina, em suas características clínicas, foi semelhante ao estro espontâneo descrito na literatura.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, A. C.; SIMPSON, M. E. *The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle)*. Geron-X Press, Los Altos, California, EUA, 1973. 209p.
- ASA, C. S.; BAUMAN, K.; CALLAHAN, P.; et al. GnRH-agonist induction of fertile estrus with either natural mating or artificial insemination, followed by birth of pups in gray wolves (*Canis lupus*). *Theriogenology*, v. 66, p. 1778-1782, 2006.
- BARTOLOME, J. A.; KAMIMURA, S.; SILVESTRE, F.; et al. The use of a deslorelin implant (GnRH agonist) during the late embryonic period to reduce pregnancy loss. *Theriogenology*, v. 65, p. 1443-1456, 2006.
- BEIJERINK, N. J.; BUIJTELS, J. J. C. W. M.; OKKENS, A. C.; et al. Basal and GnRH-induced secretion of FSH and LH in anestrus versus ovariectomized bitches. *Theriogenology*, v. 67, p. 1039-1045, 2007.
- BEIJERINK, N. J.; DIELEMAN, S. J.; KOOISTRA, H. S.; et al. Low doses of bromocriptine shorten the interestrus interval in the bitch without lowering plasma prolactin concentration. *Theriogenology*, v. 60, p. 1379-1386, 2003.
- BEREZOWSKI, C. J.; STITCH, K. L.; WENDT, K. M.; et al. Clinical comparison of 3 products available to hasten ovulation in cyclic mares. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 24, p. 231-233, 2004.
- BOUCHARD, G. F.; GROSS, S.; GRANJAM, V. K.; et al. Oestrus induction in the bitch with the synthetic oestrogen diethylstilboestrol. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47, p. 515-516, 1993.
- BOUCHARD, G. F.; YOUNGQUIST, R. S.; CLARK, B.; et al. Estrus induction in the bitch using a combination diethylstilbestrol and FSH-P. *Theriogenology*, v. 36, p. 51-65, 1991a.
- BOUCHARD, G. F.; YOUNGQUIST, R. S.; VAILLANCOURT, D.; et al. Seasonality and variability of the interestrus interval in the bitch. *Theriogenology*, v. 36, p. 41-50, 1991b.
- BURNS, P. J.; THOMPSON Jr., O.; DONAHUE, F. Pharmacodynamic evaluation of the SABER delivery system for the controlled release of deslorelin acetate for advancing ovulation in cyclic mares. *Proc. 24th Mt. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, Sweden, n. 24, p. 737-738, 1997.
- CAIN, J. L.; CAIN, G. R.; FELDMAN, E. C.; et al. Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin-releasing hormone to induce fertile estrus in bitches. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, p. 1993-1996, 1988.
- CAIN, J. L.; LASLEY, B. L.; CAIN, G. R.; et al. Induction of ovulation in bitches with pulsatile or continuous infusion of GnRH. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 39, p. 143-147, 1989.

- CHAKRABORTY, P. K.; WILDT, D. E.; SEAGER, S. W. J. Induction of estrus and ovulation in the cat and dog. *Vet. Clin. North Am.*, v. 12, p. 85-92, 1982.
- CHRISTIANSEN, I.J. *Reprodução no Cão e Gato*. São Paulo: Manole, 1988, 362p.
- CIRIT, Ü., BACINOGLU, S., CANGUL, T.; et al. The effect of a low dose of cabergoline on induction of estrus and pregnancy rates in anestrus bitches. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 101, p. 134-144, 2006.
- CONCANNON, P. W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47, p. 3-27, 1993.
- CONCANNON, P. W. Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch. *J. Reprod. Fert.*, v. 58, p. 407-410, 1980.
- CONCANNON, P. W. Estrus induction in dogs: approaches, protocols and applications. *Proc. 30th World Congress of the WSAVA*, Mexico, 2005.
- CONCANNON, P. W. Induction of fertile oestrus in anoestrus dogs by constant infusion of GnRH agonist. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 39, P. 149-160, 1989.
- CONCANNON, P. W. The physiology of ovarian cycles, pregnancy and parturition in the domestic dog. *Proc. of the Society for Theriogenology*, p. 159, 1987.
- CONCANNON, P. W. Use of GnRH agonists and antagonists for small animal contraception. *Proc. 3rd Int. Symp. on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Control Population*, EUA, 2006.
- CONCANNON, P. W.; TEMPLE, M. Perioovulatory decline and late anestrus increase in naloxone inducible LH release in adult domestic bitches. *Biol. Reprod.*, v. 36, Suppl. 1, p. 101, 1988.
- CONCANNON, P. W.; COWAN, R.; HANSEL, W. LH release in ovariectomized dogs in response to estrogen withdrawal and its facilitation by progesterone. *Biol. Reprod.*, v. 20, p. 523-531, 1979a.
- CONCANNON, P. W.; HANSEL, W.; McENTEE, K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol. Reprod.*, v. 17, p. 604-613, 1977.
- CONCANNON, P. W.; HANSEL, W.; VISEK, W.J. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol. Reprod.*, v. 13, p. 112-121, 1975.
- CONCANNON, P. W.; LASLEY, B.; VANDERLIP, S. LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrus dogs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 51, p. 41-54, 1997.
- CONCANNON, P. W.; McCANN, J. P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 39, p. 3-25, 1989.

- CONCANNON, P. W.; TEMPLE, M.; MONTANEZ, A.; 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.
- CONCANNON, P. W.; WEIGAND, N.; WILSON, S.; et al. Sexual behavior in ovariectomized bitches in response to estrogen and progesterone treatments. *Biol. Reprod.*, v. 20, p. 799-809, 1979b.
- CONCANNON, P. W.; WEINSTEIN, P.; WHALEY, S.; et al. Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and bromocriptina. *J. Reprod. Fert.*, v. 81, p. 175-180, 1987.
- CONCANNON, P. W.; WHALEY, S.; ANDERSON, S. P. Increased LH pulse frequency associated with termination of anestrus during the ovarian cycle of the dog. *Biol. Reprod.*, v. 34, Suppl. 1, abstract 119, 1986.
- De COSTER, R.; BECKERS, J. F.; BEERENS, D.; et al. A homologous radioimmunoassay for canine prolactin: plasma levels during the reproductive cycle. *Acta Endocrinologica*, v. 103, p. 473-478, 1983.
- De GIER, J.; KOOISTRA, H. S.; DJAJADININGRAT-LAANEN, S. C.; et al. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estrógeno-17 β , progesterone, prolactin and α -melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology*, v. 65, p. 1346-1359, 2006.
- DYER, R. G.; ROBINSON, J. E. The LHRH pulse generator. *J. Endocrinol.*, v. 123, p. 1-2, 1989.
- ENGLAND, G. C. W.; VERSTEGEN, J. P. Prediction of parturition in the bitch using semi-quantitative ELISA measurement of plasma progesterone concentration. *Vet. Rec.*, v. 139, p. 496-497, 1996.
- ENGLAND, G. C. W.; YEAGER, A.; CONCANNON, P. W. Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch. *In: Recent Advances in Small Animal Reproduction*, IVIS, Ithaca, Nova Iorque, EUA, 2003.
- EVANS, A. C. O.; DUFFY, P.; CROSBY, T. F.; et al. Effect of ram exposure at the end of progestagen treatment on estrus synchronization and fertility during the breeding season in ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 84, p. 349-358, 2004.
- FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60-61, p. 375-387, 2000.
- FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2004. 1089p.
- FERNANDES, P.A.; BOWEN, R. A.; KOSTAS, A. C.; et al. Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration of and number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin. *Biol. Reprod.*, v. 37, p. 804-811, 1987.

- GOBELLO, C. New GnRH analogs in canine reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 100, p. 1-13, 2006.
- GOBELLO, C.; CORRADA, Y. Biotechnology in canine reproduction: an update. *Analecta Veterinaria*, v. 23, p. 30-37, 2003.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S.E. *Reproduction in farm animals*. 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 509p.
- HATOYA, S.; TORII, R.; WIJEWARDANA, V.; et al. Induction of fertile oestrus in bitches by an intranasal spray of gonadotrophin-releasing hormone agonist. *Vet. Rec.*, v. 158, p. 378-379, 2006.
- HOFFMANN, B.; SCHNEIDER, S. Secretion and release of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrous cycle in the dog. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47, p. 85-91, 1993.
- HOFFMANN, B.; BÜSGES, F.; ENGEL, E.; et al. Regulation of corpus-luteum function in the bitch. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 39, p. 232-240, 2004.
- HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 42, p. 275-288, 1996.
- HULL, M. E.; KENIGSBURG, D.J. Gonadotropin releasing hormone: function and clinical use. *Lab. Manag.*, v. 25, p. 51-58, 1987.
- INABA, T.; TANI, H.; GONDA, M.; et al. Induction of fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate). *Theriogenology*, v. 49, p. 975-982, 1998.
- JEFFCOATE, I. A. Concentrations of luteinizing hormone and oestrógeno in plasma and response to injection of gonadotrophin-releasing hormone analogue at selected stages of anoestrus in domestic bitches. *J. Reprod. Fert.*, v. 94, p. 423-429, 1992.
- JEFFCOATE, I. A. Endocrinology of anoestrous bitches. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47, p. 69-76, 1993.
- JEFFCOATE, I. A.; LINDSAY, F. E. F. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 39, p. 277-287, 1989.
- JEUKENNE, P.; VERSTEGEN, J. Termination of dioestrus and induction of oestrus in dioestrous nonpregnant bitches by the prolactin antagonist cabergoline. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 51, p. 59-66, 1997.
- JEWGENOW, K.; DEHNHARD, M.; HILDEBRANDT, T. B.; et al. Contraception for population control in exotic carnivores. *Theriogenology*, v. 66, p. 1525-1529, 2006.
- JÖCHLE, W.; TRIGG, T. E. Control of ovulation in the mare with Ovuplant®: a short-term-release implant (STI) containing the GnRH analogue deslorelin acetate: studies from 1990 to 1994. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 14, p. 632-644, 1994.
- JOHNSTON, S. D.; ROOT-KUSTRITZ, M. V.; OLSON, P. N. *Canine and feline*

- theriogenology*. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. 584p.
- KNOBIL, E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.*, v. 36, p. 53-88, 1980.
- KOOISTRA, H. S.; OKKENS, A. C.; BEVERS, M. M.; et al. Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in the beagle bitch. *Biol. Reprod.*, v. 60, p. 65-71, 1999.
- KUMAR, M. S.; CHEN, C. L.; KALRA, S. P. Distribution of luteinizing hormone releasing hormone in the canine hypothalamus: effect of castration and exogenous gonadal steroids. *Am. J. Vet. Res.*, v. 41, p. 1304-1309, 1980.
- KUTZLER, M. A. Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology*, v. 68, p. 354-374, 2007.
- KUTZLER, M. A. Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology*, v. 64, p. 766-775, 2005.
- KUTZLER, M. A.; STANG, B.; WALDVOGEL, R.; et al. A single injection of long-acting deslorelin does not induce estrus in bitches. *Theriogenology*, v. 66, p. 668-669, 2006.
- KUTZLER, M. A.; WHEELER, R.; LAMB, S. V.; et al. Deslorelin implant administration beneath the vulvar mucosa for the induction of synchronous estrus in bitches. *Proc. Annual Meeting Eur. Vet. Soc. Small Anim. Reprod.*, p. 96, 2002.
- LOMBARDI, P.; FLORIO, S.; PAGNIN, U.; et al. Ovarian function suppression with a GnRH analogue goserelin in hormone dependent canine mammary gland cancer. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, v. 22, p. 56-61, 1999.
- McCUE, P. M.; FARQUHAR, V. J.; CARNEVALE, E. M.; et al. Removal of deslorelin (Ovuplant®) implant 48h after administration results in normal interovulatory intervals in mares. *Theriogenology*, v. 58, p. 865-870, 2002.
- McRAE, G. I.; ROBERTS, B. B.; WORDEN, A. C.; et al. Long-term reversible suppression of oestrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J. Reprod. Fert.*, v. 74, p. 389-397, 1985.
- MOSES, D. L.; SHILLE, V. M. Induction of estrus in Greyhound bitches with prolonged idiopathic anestrus or with suppression of estrus after testosterone administration. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 192, p. 1541-1545, 1988.
- OKKENS, A. C.; KOOISTRA, H. S. Anoestrus in the dog: a fascinating history. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 41, p. 291-296, 2006.
- OKKENS, A. C.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; et al. Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. *Vet. Q.*, v. 12, p. 193-201, 1990.
- OKKENS, A. C.; DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M.; et al. Evidence for the non-involvement of the uterus in the lifespan of the corpus luteum in the

- cyclic dog. *Vet. Q.*, v. 7, p. 169-173, 1985.
- OKKENS, A. C.; DIELEMAN, S. J.; BEVER, M. M.; et al. Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. *J. Reprod. Fert.*, v. 77, p. 187-192, 1986.
- OKKENS, A. C.; KOOISTRA, H. S.; DIELEMAN, S. J. Dopamine agonistic effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the influencing factor on the duration of anoestrus in bitches. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 51, p. 55-58, 1997.
- OLSON, P. N. Exfoliative cytology of the canine reproductive tract. *Proc. of the Society for Theriogenology*, p. 259, 1989.
- OLSON, P. N.; BOWEN, R. A.; BEHRENDT, M.; 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 beagle bitches. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 51, p. 203-208, 1997.
- ONCLIN, K.; MURPHY, B.; VERSTEGEN, J. P. Comparisons of estrógeno, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology*, v. 57, p. 1957-1972, 2002.
- ONCLIN, K.; SILVA, L. D. M.; DONNAY, I.; et al. Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist, cabergoline. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47, p. 403-409, 1993.
- PADULA, A. M.; MACMILLAN, K. L. Reproductive responses of early postpartum dairy cattle to continuous treatment with a GnRH agonist (deslorelin) for 28 days to delay the resumption of ovulation. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 70, p. 23-26, 2002.
- PELICAN, K. M.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B.; et al. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology*, v. 66, p. 37-48, 2006.
- PHEMISTER, R. D.; HOLST, P. A.; SPANO, J. S.; et al. Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol. Reprod.*, v. 8, p. 74-82, 1973.
- POPE, C. E.; GOMEZ, M. C.; DRESSER, B. L. In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. *Theriogenology*, v. 66, p. 1518-1524, 2006.
- ROTA, A.; MOLLO, A.; MARINELLI, L.; et al. Evaluation of cabergoline and buserelin efficacy for oestrous induction in the bitch. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 38, p. 440-443, 2003.
- RUBION, S.; DESMOULINS, P. O.; RIVIÈRE-GODET, E.; et al. Treatment with a subcutaneous GnRH agonist containing controlled release device reversibly prevents puberty in bitches. *Theriogenology*, v. 66, p. 1651-1654, 2006.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2. ed. Belo

Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.

SANTOS, J. E. P.; BARTOLOME, J. A.; CERRI, R. L. A.; et al. Effect of deslorelin implant in a timed artificial insemination protocol on follicle development, luteal function and reproductive performance in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v. 61, p. 421-435, 2004.

SHILLE, V. M.; THATCHER, M. J.; SIMMONS, K. J. Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 184, p. 1469-1473, 1984.

SHILLE, V. M.; THATCHER, M. J.; LLOYD, M. L.; et al. Gonadotrophic control of follicular development and the use of exogenous gonadotrophins for induction of oestrus and ovulation in the bitch. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 39, p. 103-113, 1989.

SQUIRES, E. L.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; et al. Effect of dose of GnRH analog on ovulation in mares. *Theriogenology*, v. 41, p. 757-769, 1994.

STITCH, K. L.; WENDT, K. M.; BLANCHARD, T. L.; et al. Effects of a new injectable short-term release deslorelin in foal-heat mares. *Theriogenology*, v. 62, p. 831-836, 2004.

STONE, E. A. Ovary and uterus. In: SLATTER, D. H. (Ed.) *Small animal surgery*. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2002. p. 1487-1502.

STRÖM HOLST, B.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; et al. Prediction of the oocyte recovery rate in

the bitch. *J. Vet. Med.*, v. 48, p. 587-592, 2001.

SUNG, M.; ARMOUR, A. F.; WRIGHT, P. J. The influence of exogenous progestin on the occurrence of proestrous or estrous signs, plasma concentrations of luteinizing hormone and estrógeno in deslorelin (GnRH agonist) treated anestrous bitches. *Theriogenology*, v. 66, p. 1513-1517, 2006.

TANI, H.; INABA, T.; TAMADA, 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.

TARLATZIS, B. C.; BILL, H. Safety of GnRH agonists and antagonists. *Expert Opin. Drug Saf.*, n. 1, v. 3, p. 39-46, 2004.

TARLATZIS, B. C.; FAUSER, B. C.; KOLIBIANAKIS, E. M.; et al. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Hum. Reprod. Update*, v. 4, p. 333-340, 2006.

TRIGG, T. E.; DOYLE, A. G.; WALSH, J. D.; et al. A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology*, v. 66, p. 1507-1512, 2006.

TRIGG, T. E.; WRIGHT, P. J.; ARMOUR, A. F.; et al. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 57, p. 255-261, 2001.

- TSUTSUI, T.; SHIMADA, K.; NISHI, M.; et al. An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Nippon Juigaki Zasshi*, v. 51, p. 797-800, 1989.
- VAN HAAFTEN, B.; BEVERS, M. M.; VAN DEN BROM, W. E.; et al. Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch. *J. Reprod. Fert.*, v. 101, p. 221-225, 1994.
- VANDERLIP S.; WING, A.; LINKE, D.; et al. Ovulation induction in anestrus bitches by pulsatile administration of gonadotrophin releasing hormone (GnRH). *Lab. Anim. Sci.*, v. 37, p. 459-464, 1987.
- VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K., SILVA, L. D. M.; et al. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology*, v. 51, p. 597-611, 1999.
- VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K., SILVA, L. D. M.; et al. Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in dogs by administration of purified pig LH. *J. Reprod. Fert.*, v. 111. p. 35-40, 1997.
- VICKERY, B. H.; McRAE, G. I.; GOODPASTURE, J. C.; et al. Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination in dogs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 39, p. 175-187, 1989.
- VOLKMANN, D. H.; KUTZLER, M. A.; WHEELER, R.; et al. Failure of hCG to support luteal function in bitches after estrus induction using deslorelin implants. *Theriogenology*, v. 66, p. 1502-1506, 2006.
- WANKE, M. M.; FARINA, J.; LOZA, M. H.; et al. Induction of estrus in bitches with normal and persistent anestrus using human menopausal gonadotrophin (hMG). *Theriogenology*, v. 47, p. 935-942, 1997.
- WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L.; et al. Repeated use of deslorelin STI for acceleration of ovulation in mares without loss of effectiveness. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 29, p. 247, 1994.
- WRIGHT, P. J.; VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K.; et al. Suppression of the oestrous responses of bitches to the GnRH analogue deslorelin by progestin. *J. Reprod. Fert.*, v. 57, p. 263-268, 2001.
- ZÖLDÁG, L.; FELCETE, S.; CSÁKY, I.; et al. Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology*, v. 55, p. 1657-1666, 2001.

10. ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 106/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Efeito do dietilestilbestrol sobre o aparelho genital de cadelas em anestro**", que tem como responsável **Antônio de Pinho Marques Júnior**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 08/2007**.

Este certificado expira-se em **22/ 08 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 106/2007**, related to the project entitled "**Effect of diethylstilbestrol on the reproductive tract of anestrus bitches**", under the supervision of **Antônio de Pinho Marques Júnior**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 22, 2007**.

This certificate expires in **August 22, 2012**.

Belo Horizonte, 26 de Setembro de 2007.

Prof. Humberto Ferreira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

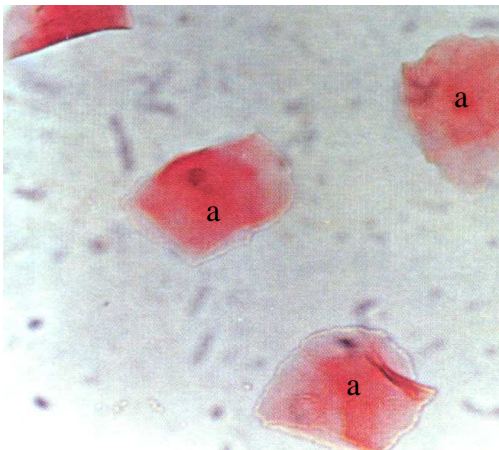
Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

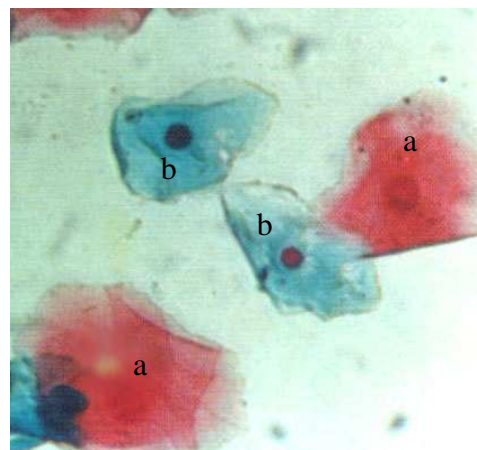
ANEXO 2 – Método de coloração hematoxilina-Shorr utilizada para citologia vaginal

Etapas:

- a) Fixar a lâmina em álcool etílico 95% durante 10 min. Transferí-la para um recipiente com álcool a 70%
- b) Lavar as lâminas em cuba com água destilada ou água corrente, durante 1 a 5 min.
- c) Hematoxilina de Harris - 3 min.
- d) Água corrente - 5min.
- e) Álcool etílico 95% - 1 min.
- f) Corante de Shorr - 7 min.
- g) Água destilada - mergulhar 15 vezes
- h) Álcool I (95%) - 1 min.
- i) Álcool II (95%) - 1 min.
- j) Álcool III (95%) - 1 min.
- k) Xilol - 1 min.
- l) Montar a lâmina com bálsamo e lamínula



Citologia vaginal de cadela do Grupo 2 em estro, corada pelo método de hematoxilina-Shorr
a – células superficiais



Citologia vaginal de cadela do Grupo 2 em proestro, corada pelo método hematoxilina-Shorr
a – células superficiais
b – células intermediárias