

## Correlação das características citológicas vaginais de *Rattus norvegicus* com os níveis séricos de 17- $\beta$ estradiol

### Gabrielle Gan

Universidade Estadual do Paraná, campus de União da Vitória.

Contato: gabigan95@gmail.com

### Josi Mariano Borille

Universidade Estadual do Paraná, campus de União da Vitória.

Contato: jmborille@yahoo.com.br

### Caroline Bacil

Universidade Estadual do Paraná, campus de União da Vitória.

Contato: caarolinebacil@gmail.com

### Camila Juraszeck Machado

Universidade Estadual do Paraná, campus de União da Vitória.

Contato: kmila\_j@hotmail.com

### Carla Cristine Kanunfre

Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG.

Contato: cckanunfre@gmail.com

**Resumo:** O ciclo reprodutivo dos mamíferos não primatas é chamado de ciclo estral, assim as ratas são ditas poliestrals e apresentam ciclo estral constituído por quatro fases distintas, Proestro, Estro, Metaestro e Diestro. Uma das maneiras para identificar essas fases é através da técnica do esfregaço vaginal e posterior análise microscópica, porém ainda existem poucos e divergentes estudos sobre ela. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi correlacionar as características citológicas vaginais de fêmeas de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar com os respectivos níveis de 17- $\beta$  estradiol, classificando as lâminas de esfregaços vaginais quanto a fase do ciclo estral e comparando os resultados aos níveis hormonais. Foram utilizadas 18 ratas para a coleta do material vaginal, realizada através da técnica do esfregaço vaginal. Após isso os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para coleta de sangue e soro e determinação hormonal. Para a identificação das fases do ciclo estral as lâminas obtidas através do esfregaço vaginal foram analisadas quanto à presença e tipos celulares por microscopia de luz nos aumentos de 10 e 40 vezes. Após identificação das fases e obtenção dos resultados dos níveis hormonais foram realizadas as comparações e as correlações das fases identificadas com a concentração de 17- $\beta$  estradiol. Houve correlação dos resultados obtidos nas lâminas com os obtidos na análise hormonal para 66,66% das amostras. A fase mais frequente nos três dias de estudo foi a fase de Diestro, tanto pela análise das lâminas quanto pela avaliação hormonal dos níveis séricos de 17- $\beta$  estradiol, com 49,99% e 83,33% de frequência, respectivamente. Dessa forma, inferimos que a técnica do esfregaço vaginal pode ser eficiente para identificação das fases do ciclo estral de ratas, porém ressaltamos a importância dessa com a dosagem hormonal.

**Palavras-chave:** Correlação; Ciclo estral; Ratas Wistar; Esfregaço vaginal; 17- $\beta$  estradiol.

### Correlation of cytological characteristics of vaginal *Rattus norvegicus* with serum levels of 17- $\beta$ estradiol

**Abstract:** The reproductive cycle of non-primate mammals is called the estrous cycle, thus the rats are called polystral and have estrous cycle consisting of four distinct phases, Proestro, Estrus, Metaestro and Diestro. One of the ways to identify these phases is through the vaginal smear technique and subsequent microscopic analysis, however, there are still few and divergent studies on it. In this way, the

aim of this study was to correlate the vaginal cytological characteristics of Wistar *Rattus norvegicus* females with their respective 17- $\beta$  estradiol levels, classifying vaginal swab slides for estrous cycle phase. Eighteen rats were used to collect vaginal material, performed by the vaginal smear technique. After that the animals were sacrificed by decapitation for blood and serum collection and hormonal determination. For the identification of the estrous cycle phases, the slides obtained through the vaginal swab were analyzed for the presence and cell types by light microscopy at 10 and 40 X increments. After identifying the phases and obtaining the results of the hormone levels, comparisons and correlations of the identified phases with the concentration of 17- $\beta$  estradiol were performed. The results obtained in the slides were correlated with those obtained in the hormonal analysis for 66.66% of the samples. The most frequent phase in the three days of study was the Diestrus phase, by both slide analysis and hormone assessment of serum 17- $\beta$  estradiol levels, with 49.99% and 83.33% frequency, respectively. Thus, we infer that the vaginal smear technique can be efficient for identifying the stages of the estrous cycle of rats, however, we emphasize the importance of this with hormonal dosage.

**Keywords:** correlation; estrous cycle; wistar rats; vaginal smear; 17- $\beta$  estradiol.

#### Como citar este artigo:

GAN, G.; BORILLE, J.M.; BACIL, C.; MACHADO, C.J.; KANUNFRE, C.C. Correlação das características citológicas vaginais de *Rattus norvegicus* com os níveis séricos de 17- $\beta$  estradiol. **Luminária**, União da Vitória, v.21, n.02, p. 17 – 27, 2019.

## INTRODUÇÃO

A reprodução em vertebrados é comumente uma atividade estacional ou cíclica (HICKMAN et al., 2016), sendo o processo reprodutivo sexuado influenciado por vários estímulos ambientais diferentes, mas, basicamente, controlado por hormônios (ORR, 1986).

Os ciclos reprodutivos dos mamíferos podem ser classificados em ciclo estral, que é o ciclo característico da maior parte deles, ou ciclo menstrual, que ocorre apenas nos primatas antropóides, grupo representado pelo orangotango, gibão, chimpanzé, gorila e humanos (HICKMAN et al., 2016). Em ambos os ciclos ocorrem mudanças na estrutura dos órgãos genitais e dos tecidos uterinos (FONTES, 2012).

De acordo com Santos e Ferrazoli (2015), o ciclo estral é o período que ocorre entre consecutivas fases de receptividade sexual, o qual normalmente é chamado de estro ou cio. Os períodos reprodutivos podem ser classificados como ciclos estrais contínuos ou estacionais e os ciclos podem ser monoestrais (quando ocorrem uma vez por ano) ou poliestrais (quando ocorrem duas ou mais vezes por ano).

Nas ratas, o ciclo estral tem seu início com a puberdade, cerca de 60 dias após o nascimento do animal e perdura até o fim da vida

reprodutiva (SIROIS, 2007). O ciclo reprodutivo dos roedores, como o camundongo, é conhecido como ciclo estral e tem curta duração de 4 a 5 dias, sendo caracterizado por mudanças morfológicas nos ovários, útero e vagina. No caso das ratas, um ciclo estral sucede o outro, sem que haja nenhum período prolongado de inatividade sexual, por isso as fêmeas são ditas poliestrais contínuas (ORR, 1986). Este ciclo dura de 4 a 6 dias e divide-se em 4 fases, sendo elas: Proestro, Estro, Metaestro (ou Diestro I) e Diestro (ou Diestro II), as quais apresentam caracterização morfológica celular específica na mucosa vaginal em cada uma delas (FONTES, 2012; SIROIS, 2007; MATARRAIA et al., 2009).

O Proestro é um período de preparação caracterizado pelo crescimento de novos folículos ovarianos (HICKMAN et al., 2012) e apresenta altos níveis de estradiol (VILELA et al., 2007) e células vaginais grandes e nucleadas (FONTES, 2012). O Proestro é seguido pela segunda fase, o Estro (VILELA et al., 2007), fase na qual há grande quantidade de células corneificadas. É nesta fase que ocorre o acasalamento (HICKMAN et al., 2016).

Quase simultaneamente os folículos ovarianos rompem-se, liberando óvulos que são fertilizados, sendo que o óvulo fertilizado implanta-se na parede uterina e assim, segue-se a prenhez, porém quando o acasalamento

ou a fertilização não acontecem, ocorre o período de reparo, chamado Metaestro (HICKMAN et al., 2016), período no qual há predominância de leucócitos e algumas células anucleadas e corneificadas (FONTES, 2012). Após o Metaestro, ocorre a fase do Diestro, onde o útero torna-se anêmico e pequeno, e há predominância de leucócitos e algumas células epiteliais (MARCONDES, 1998).

Os roedores possuem ciclo estral de breve duração, prenhez relativamente curta e são considerados animais de fácil manejo, assim, por esses motivos, são frequentemente utilizados em experimentos científicos, mais precisamente, reprodutivos (MARTINS et al., 2005). Além disso, o estudo do ciclo estral em ratas wistar é considerado um importante meio experimental devido à sua curta duração e fácil visualização das características citológicas (MARCONDES, 1998).

Cada uma das fases do ciclo estral apresenta modificações periódicas e que são relacionadas a atividade sexual das fêmeas e há várias maneiras de observar e distinguir essas modificações, tanto a nível celular quanto tecidual, bem como a nível de comportamento dos animais e uma das maneiras de identificar e classificar facilmente essas fases é através da técnica de esfregaços vaginais e posterior análise microscópica (CARDOZO, 2002).

Por meio desta técnica pode-se analisar diariamente os tipos de células que descamam do epitélio vaginal (CALLEGARI, 2008), sendo possível visualizar a proporção entre três tipos celulares diferentes, as células epiteliais, células cornificadas e leucócitos (MARCONDES, 1998; MATARRAIA et al., 2009). Ademais, com a análise das células vaginais por meio da técnica do esfregaço vaginal, é possível determinar a duração do ciclo e a regularidade de múltiplos ciclos para cada rata (BECKER et al., 2005).

Dados bibliográficos revelam a existência de alguns estudos sobre o ciclo estral em ratas, como os de Vilela et al. (2007), Marcondes (1998), Marcondes et al., (2002) e Borille (2011). No entanto, existem divergências entre os autores em relação às características presentes em cada uma das fases, além disso, ainda são poucos os estudos que correlacionam as características citológicas vaginais de

*Rattus norvegicus* com os níveis hormonais de 17- $\beta$  estradiol, permanecendo dúvidas quanto a efetividade e validade desta técnica. Com base nessas evidências, objetivou-se a realização deste estudo para verificar a possível existência de correlação entre as características citológicas vaginais de *Rattus norvegicus* com os níveis séricos de 17- $\beta$  estradiol.

## MATERIAL E MÉTODOS

O modelo animal utilizado para o experimento foram 18 ratas fêmeas (Quadro 1) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* variedade albinus), com idade entre 110 e 130 dias, as quais foram fornecidas pelo Biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Anteriormente ao experimento, os animais receberam ração (Purina) e água *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com controle de temperatura (25°C) e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos adotados seguiram as normativas de experimentação animal preconizada pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) que salienta aspectos de trato e uso humanitário com animais de laboratório, bem como obtiveram aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UEPG, registrado sob número 03511/2010.

A coleta do material vaginal foi realizada através da técnica do esfregaço vaginal das fêmeas, em três dias consecutivos, para posterior identificação da fase do ciclo estral. Para tanto, as ratas foram imobilizadas e introduziu-se na vagina da rata um cotonete umedecido em solução fisiológica, coletando-se o material epitelial com movimentos rotatórios delicados. Posteriormente, o material foi estendido sobre uma lâmina limpa, sendo fixado com uma solução álcool éter (3:1) e corado com hematoxilina e eosina (HE) (LEITE, 2008; BORILLE, 2011).

Foram preparadas 18 lâminas ao total, sendo estas em duplicata, totalizando assim, 36 observações (36 lamínulas), como demonstrado no Quadro 1.

Após a coleta do material vaginal, foi realizada a eutanásia dos animais por decapitação e os mesmos foram vertidos rapidamente sobre funis acoplados a tubos de vidros, os quais foram deixados em repouso em tempe-

Correlação das características citológicas vaginais...

ratura ambiente por aproximadamente 3 horas para completa coagulação sanguínea.

Para a obtenção do soro, realizou-se a centrifugação a 600 rpm (centrífuga clínica da marca BioEng BE-4004). O soro foi colocado em tubos tipo *ependorfe* armazenados em freezer em temperatura de -20°C.

Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para análise hormonal de 17-β estradiol. A concentração sérica de 17-β estra-

diol foi determinada por quimiluminescência, através de serviço terceirizado pelo laboratório de análises clínicas Louis Pasteur, no município de União da Vitória, Paraná.

Os resultados das análises hormonais foram classificados conforme valores de referência apresentados no laudo e em consulta à literatura, conforme Quadro 2.

**Quadro 1.** Número de animais utilizados (ratas wistar) e lâminas produzidas por dia pela técnica de esfregaço vaginal, nos três dias de experimentos realizados no laboratório da UEPG para a identificação da fase do ciclo estral e análise hormonal.

Dias	1º Dia	2º Dia	3º Dia	Total
Número de Animais	6	6	6	18
Número de lâminas (com 2 lâminulas cada)	6 x 2 lâminulas	6 x 2 lâminulas	6 x 2	18 lâminas e 36 lâminulas

**Quadro 2.** Concentração de estradiol em nanogramas por decilitro (ng/dL) nas diferentes fases do ciclo estral em ratas, conforme Santos (2006). (\*) Valores apresentados em forma de média e desvio padrão; Valores com letras diferentes representam diferença significativa (p<0,05); 1- ANOVA e LSD (pos hoc)

Fase do Ciclo	Concentração de estradiol Ng/Dl	Varição (Max./Min.)
Diestro	6,452± 1,816a	4,15-9,86
Metaestro	7,398± 9,964 <sup>a,c</sup>	0,35-30,50
Estro	21,472± 25,123b,c	3,08-57,61
Proestro	22,685± 10,964b,c	10,21-30,78
P <sup>1</sup>	0,042	

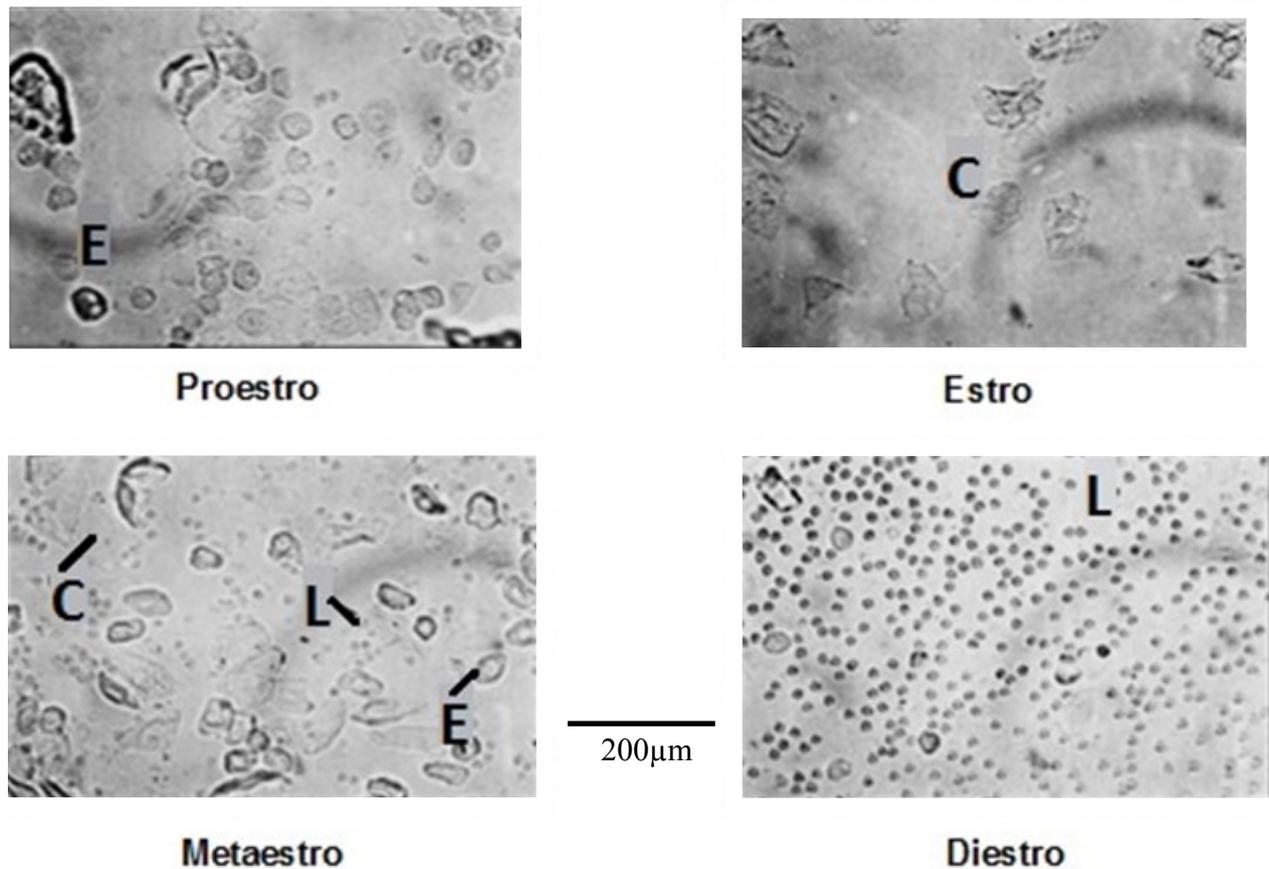
As lâminas obtidas através do esfregaço foram analisadas quanto à presença de tipos celulares por microscopia de luz nos aumentos de 10 e 40 vezes.

Em seguida, foram classificadas de acor-

do com as fases do ciclo estral por meio de comparação com imagens de laminário fornecido por Marcondes (1998) e Marcondes et al. (2002), apresentados no Quadro 3 e Figura 1, respectivamente.

**Quadro 3.** Caracterização e descrição microscópica observada através do esfregaço vaginal, nas quatro fases do ciclo estral de ratas conforme Marcondes (1998) e Marcondes et al. (2002).

Fase	Diestro	Proestro	Estro	Metaestro
Caracterização.	Fase em que o epitélio vaginal não sofre ação hormonal (fase de repouso).	Fase onde encontra-se evidente a ação do estrogênio sobre o epitélio vaginal.	Fase de ação máxima do estrogênio (onde ocorre a cópula).	Fase luteínica.
Descrição microscópica observada através do esfregaço vaginal.	Predominância de leucócitos.	Predominância de células epiteliais grandes, nucleadas e redondas.	Presença de células corneificadas e anucleadas.	Predominância de leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas e outras corneificadas.



**Figura 1.** Nas figuras são marcadas as células encontradas nas diferentes fases, sendo: L (leucócitos); E (epiteliais); C (cornificadas). A observação dos esfregaços vaginais foi realizada em microscópio comum com objetiva de 40 X. **Fonte:** Adaptado de Marcondes et al. (2002).

## RESULTADOS

Neste estudo investigou-se a possível correlação entre duas técnicas utilizadas para identificar a fase do ciclo estral de ratas, os exames laboratoriais que demonstram os níveis séricos de 17- $\beta$  estradiol e a coleta de células vaginais através da técnica do esfregaço vaginal. Para isso, foram avaliadas 18 fêmeas de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, variedade albinus. Assim, obteve-se um total de 18 lâminas, sendo estas em duplicata, totalizando assim 36 observações (36 lamínulas).

Conforme análise das lâminas obtidas através do esfregaço vaginal das fêmeas de *Rattus norvegicus*, a fase do ciclo estral mais frequente durante os três dias de experimento foi a fase de Diestro, com um total de 49,99%, seguida da fase de Estro (38,88%) como demonstrado na Tabela 1.

Na avaliação hormonal dos níveis séricos de 17- $\beta$  estradiol, a fase mais frequente foi Diestro com média de 83,33% de ocorrência

nos três dias observados, seguida da fase de Estro (16,66%) (Tabela 2).

Em relação a comparação dos resultados obtidos analisando-se os níveis séricos de 17- $\beta$  estradiol e as observações microscópicas das células presentes nos esfregaços vaginais, pôde-se verificar a existência de correlação dos resultados obtidos nas lâminas com os obtidos na análise hormonal em 66,66% das amostras (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

O principal objetivo deste estudo foi verificar a possível correlação entre ambos os procedimentos já citados, para assim, confirmar a técnica do esfregaço vaginal como válida e eficiente na identificação das fases do ciclo estral de *Rattus norvegicus*, quando comparado aos níveis séricos de 17- $\beta$  estradiol.

Para Becker et al. (2005), as concentrações hormonais de estradiol são medidas preferencialmente no soro diretamente, porém, o

**Tabela 1.** Frequência parcial e média das fases do ciclo estral das fêmeas de *Rattus norvegicus* obtidas nos três dias de observação das lâminas preparadas através da técnica do esfregaço vaginal.

Fases do ciclo estral	1º Dia		2º Dia		3º Dia		Média	
	Números absolutos	Números relativo						
Lâminas								
Estro	6 lâminas	0,3333	9 lâminas	0,5	6 lâminas	0,3333	7 lâminas	0,3888
Proestro	6 lâminas	0,3333	0 lâminas	0	0 lâminas	0	2 lâminas	0,1111
Diestro	6 lâminas	0,3333	9 lâminas	0,5	12 lâminas	0,6666	9 lâminas	0,4999
Metaestro	0 lâminas	0						
<b>Total</b>	<b>18 lâminas</b>	<b>0,9999</b>	<b>18 lâminas</b>	<b>1</b>	<b>18 lâminas</b>	<b>0,9999</b>	<b>18 lâminas</b>	<b>0,9998</b>

**Tabela 2.** Frequência parcial e média das fases do ciclo estral das fêmeas de *Rattus norvegicus* observadas nos três dias de experimento através da identificação dos níveis séricos de 17- $\beta$  estradiol.

Fases do ciclo estral	1º Dia		2º Dia		3º Dia		Média	
	Números absolutos	Números relativos						
<b>Estro</b>	<b>3</b>	<b>0,1666</b>	<b>3</b>	<b>0,1666</b>	<b>3</b>	<b>0,1666</b>	<b>3</b>	<b>0,1666</b>
	roedores		roedores		roedores		roedores	
Proestro	0	0	0	0	0	0	0	0
	roedores		roedores		roedores		roedores	
Diestro	15 roedores	0,8333						
Metaestro	0	0	0	0	0	0	0	0
	roedores		roedores		roedores		roedores	
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>0,9999</b>	<b>18</b>	<b>0,9999</b>	<b>18</b>	<b>0,9999</b>	<b>18</b>	<b>0,9999</b>
	roedores		roedores		roedores		roedores	

autor, admite que é evidente que as mudanças hormonais resultam em alterações na citologia vaginal, sendo que a observação do epitélio vaginal pode ser suficiente para verificar indiretamente as mudanças hormonais.

Cardozo (2002) e Vilela et al. (2007), afirmam que a técnica do esfregaço vaginal consiste em um método amplamente utilizado em estudos relacionados à biologia reprodutiva, pois caracteriza-se em ser um método vantajoso através do qual pode-se estudar as modificações que ocorrem na citologia vaginal do animal em cada uma das fases, sendo possível, desta forma monitorar o ciclo estral de maneira fácil, não invasiva e sem que seja preciso o sacrifício deste, além de ser considerado um método rápido, pois a coleta da secreção vaginal e o uso do material corado leva em média, de uma a duas horas apenas (MARCONDES et al., 2002).

Entretanto, apesar da técnica do esfregaço vaginal ser citada na literatura como vantajosa para o estudo do ciclo estral em ratas (MARCONDES, 1998; MARCONDES et al., 2002; BECKER et al., 2005; CARDOZO, 2002; VILELA et al., 2007), ainda existem divergências entre autores, quanto à caracterização das diferentes fases existentes no ciclo (Quadro 4), assim como inexistem estudos que correlacionem ambas as técnicas.

Mediante a essas informações, é necessário lembrar que as lâminas deste estudo foram classificadas por meio de comparação com imagens de laminário fornecido por Marcondes (1998), Marcondes et al. (2002), já apresentadas na metodologia.

Os resultados das análises microscópicas dos esfregaços vaginais mostraram que a fase mais frequente foi a de Diestro, sendo que a mesma apresentou em média 49,99%, de frequência nos três dias de observações.

**Tabela 3.** Correlação dos resultados obtidos analisando-se os níveis séricos de 17- $\beta$  estradiol e as observações microscópicas das células presentes nos esfregaços vaginais das fêmeas de *Rattus norvegicus* (identificadas na tabela como roedores).

Dia correspondente	Animal analisado	Resultado do nível sérico de estradiol (pM)	Fase Correspondente de acordo com o nível hormonal	Fase correspondente de acordo como esfregaço vaginal	Correlação
1º Dia	Roedor 1	32,7	Estro	Estro	Sim
	Roedor 2	5	Diestro	Diestro	Sim
	Roedor 3	5	Diestro	Estro	Não
	Roedor 4	7,8	Diestro	Proestro	Não
	Roedor 5	5	Diestro	Diestro	Sim
	Roedor 6	5	Diestro	Proestro	Não
2º Dia	Roedor 1	6,4	Diestro	Diestro	Sim
	Roedor 2	9	Diestro	Diestro	Sim
	Roedor 3	5	Diestro	Diestro	Sim
	Roedor 4	5	Diestro	Estro	Não
	Roedor 5	50,2	Estro	Estro	Sim
	Roedor 6	5,1	Diestro	Estro	Não
3º Dia	Roedor 1	6,5	Diestro	Diestro	Sim
	Roedor 2	7,8	Diestro	Diestro	Sim
	Roedor 3	689,8	Estro	Estro	Sim
	Roedor 4	5	Diestro	Estro	Não
	Roedor 5	5,7	Diestro	Diestro	Sim
	Roedor 6	9,9	Diestro	Diestro	Sim
<b>Total:</b>	<b>18 ROEDORES (100%)</b>		<b>CORRELAÇÃO PARA 12 ROEDORES: 66,66%</b>		

A fase Diestro é a fase onde não há ocorrência acasalamento (CARDOZO, 2002), pois é a fase onde ocorre a regeneração do útero (FONTES, 2012). Nas células vaginais são encontradas apenas leucócitos (MARCONDES et al., 2002). Ainda segundo Cardozo (2002), a abertura vaginal encontra-se reduzida ou até mesmo fechada, característica que não é observada nas demais fases.

Já a fase Estro, que apresentou uma média de 38,88% nos três dias em que realizou-se o esfregaço vaginal, coincide com o máximo desenvolvimento dos órgãos que estão associados com a ovulação e refere-se estritamente ao período no qual a fêmea permite a copulação. Ocorre diminuição da proliferação do epitélio vaginal (VILELA et al., 2007), sendo que no esfregaço vaginal há presença de células cornificadas e anucleadas (MARCONDES et al. 2002). As células vaginais apresentam-se com uma forte descamação (FONTES, 2012).

A fase de Proestro apresentou-se com

uma menor taxa de ocorrência nos dias estudados, sendo que apresentou 11,11% de frequência em média nas análises microscópicas dos esfregaços vaginais. A fase Proestro corresponde a fase anabólica (preparatória e construtiva), onde ocorre o crescimento das mucosas do trato reprodutor feminino (CARDOZO, 2002).

Nesta fase do ciclo, assim como em Estro, os níveis de estradiol encontram-se mais elevados e nesta ocorre o pico do hormônio luteinizante (VILELA et al., 2007). No esfregaço vaginal há a presença de células epiteliais nucleadas (MARCONDES et al., 2002), sendo que não há presença de leucócitos (FONTES, 2012).

Já a fase Metaestro não teve ocorrência nos três dias observados, sendo que esta corresponde a fase caracterizada por mudanças degenerativas no aparelho genital. As células vaginais apresentam-se anucleadas e cornificadas e há também a presença de leucócitos e de

**Quadro 4.** Caracterização das fases existentes do ciclo estral de ratas, apresentadas por diferentes autores. .

<b>Autores</b>	<b>Estro</b>	<b>Proestro</b>	<b>Metaestro</b>	<b>Diestro</b>
Cardozo (2002) - Padronização da metodologia para obtenção de deciduoma em ratas ( <i>Rattus norvegicus</i> , var. <i>Wistar</i> ).	Presença de células corneificadas muito bem evidenciadas e ausência de leucócitos.	Células nucleadas e corneificadas e não são encontrados leucócitos.	Apresenta leucócitos e na fase inicial pode-se detectar células corneificadas, anucleadas e nucleadas.	Há uma proliferação de leucócitos polimorfos nucleados e poucas células epiteliais.
Vilela et al. (2007) - Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal.	Grande quantidade de células corneificadas e não há presença de leucócitos.	Predomínio de células epiteliais nucleadas que encontram-se dispersas ou agrupadas.	(Diestro I) leucócitos em número mais alto, algumas células corneificadas algumas células epiteliais.	(Diestro II), presença de leucócitos.
Leite (2008) – Ciclo estral e menstrual: Repercussão da agressão nutricional precoce sobre parâmetros locomotores em ratas e consequências sobre as propriedades neuro-mecânicas em mulheres jovens.	Células corneificadas e anucleadas.	Células epiteliais nucleadas e anucleadas.	Células anucleadas e leucócitos.	Predominância de leucócitos.
Moreira (2011) - Dieta hiperlipídica e envelhecimento modificam a sensibilidade à insulina e a expressão das proteínas relacionadas à via intracelular da insulina em hipotálamo de camundongos fêmeas.	Mudança do epitélio vaginal com presença de células queratinizadas.	Células epiteliais nucleadas e algumas corneificadas.	Grande quantidade de leucócitos e algumas células nucleadas e corneificadas.	Presença de leucócitos e algumas poucas células epiteliais e corneificadas.
Fontes (2012) - Ação central da ocitocina no controle da ingestão alimentar: influência do ciclo estral.	Células anucleadas, corneificadas ou queratinizadas e com uma forte descamação.	Células grandes e nucleadas e sem a presença de leucócitos.	Células anucleadas e corneificadas e presença de leucócitos e de algumas células epiteliais nucleadas.	Presença de muco e de leucócitos polimorfos nucleares.

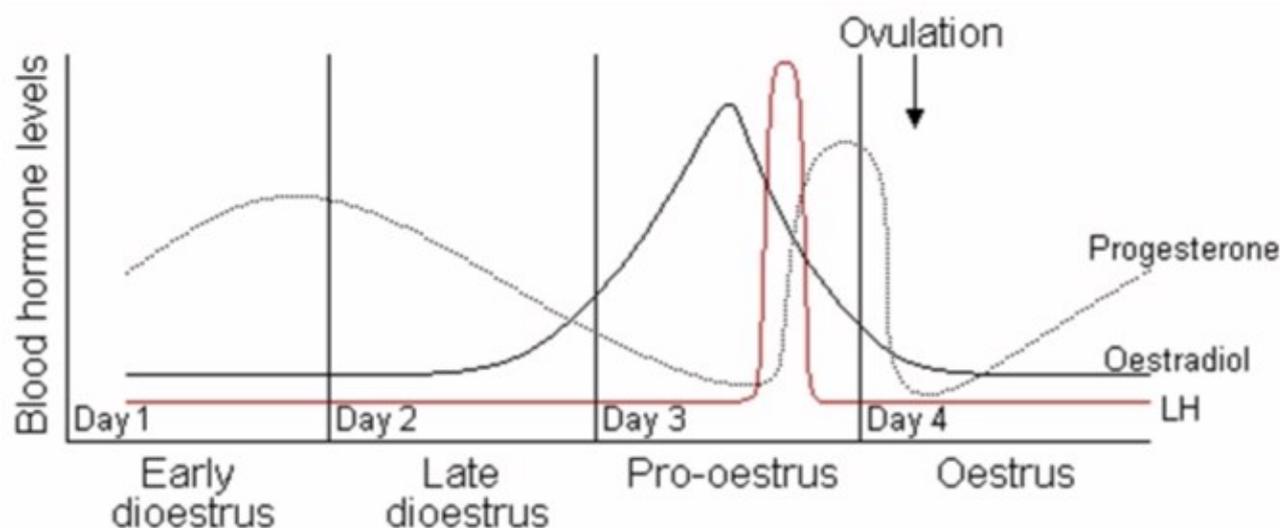
algumas células epiteliais nucleadas (FONTES, 2012; MARCONDES et al., 2002).

Pôde-se verificar nos resultados dos exames laboratoriais dos níveis séricos de 17- $\beta$  estradiol, que a fase mais frequente foi a de Diestro apresentando também a média mais alta (83,33%), seguida da fase de Estro, com média de 16,66% nos três dias observados. Nos resultados obtidos, também não houve presença da fase Metaestro, bem como, da fase Proestro.

É importante destacar que a maioria dos pesquisadores (MARCONDES, 1998; MARCONDES et al., 2002; BECKER et al., 2005; CARDOZO, 2002; VILELA et al., 2007), utiliza o exame da citologia vaginal em intervalos de 24 horas, pois a análise citológica vaginal deve ser verificada diariamente e ao mesmo tempo em cada dia, para que assim seja possível verificar as quatro fases presentes no ciclo estral regular das ratas. Porém, vale ressaltar que se as amostras são coletadas em intervalos de 24 horas, nem todas as fases

são sequencialmente vistas a partir do esfregaço vaginal da rata, pois algumas fases estão a menos de 24 horas (BECKER et al., 2005), como as fases de Proestro e Metaestro que duram cerca de 12 horas cada. Enquanto que a fase de Estro dura cerca de 24 horas, a de Diestro tem duração de cerca de 60 horas (CARDOZO, 2002). Tais informações podem auxiliar a compreender porque algumas fases são mais ou menos frequentes.

Durante o ciclo estral, os níveis de prolactina, LH e FSH são baixos, mas tendem a aumentar na fase de Proestro. Já os níveis de secreção de progesterona, aumentam durante as fases de Metaestro e Diestro, com uma diminuição posteriormente. No final da fase Proestro o valor de progesterona aumenta novamente para alcançar o seu segundo pico. Em relação aos níveis de estradiol, ocorre início do aumento na fase de Metaestro, sendo que os níveis máximos são atingidos na fase de Proestro e retomados aos valores basais na fase de Estro. Na fase Diestro, as concentrações de estradiol encontram-se em níveis



**Figura 2.** Alterações hormonais (estradiol, progesterona e LH) existentes durante o ciclo estral em ratas. **Fonte:** SANTOS (2006).

mais baixos. (MARCONDES et al., 2002) (Figura 2).

Segundo Marcondes (1998), há diferenças entre os níveis de estradiol em soro de ratas quando estes são observados pela manhã ou pela noite, tendo em vista que seu estudo constatou que, pela manhã, os níveis de estradiol de ratas na fase de Proestro apresentaram-se maiores do que aqueles de ratas nas fases de Estro, Metaestro e Diestro, em 2,2; 2,7 e 2,5 respectivamente. Porém, entre as 17 e 18 horas, somente houve aumento da fase Proestro em relação a fase Metaestro, em 3,8 vezes, no entanto, não foi verificado aumento em relação as outras duas fases (Estro e Diestro). Além disso, os níveis séricos de estradiol foram maiores quando observados pela manhã do que quando observados a tarde, nas quatro fases apresentadas.

Nesta pesquisa verificou-se uma correlação de 66,66% entre as técnicas analisadas. Assim, a técnica do esfregaço vaginal não foi inteiramente efetiva para a identificação das fases do ciclo estral. Desta maneira, concorda-se com Nogueira et al. (2019), os quais concluem que apesar da citologia vaginal ser considerado um método importante para o diagnóstico da fase do ciclo estral, quando associada às dosagens hormonais, o resultado apresenta-se mais confiável, evitando possíveis erros na detecção da fase do ciclo estral. Para mais, são inúmeros os fatores que podem

provocar alterações no ciclo estral de roedores. Camundongas, por exemplo, quando agrupadas numa mesma gaiola podem apresentar aciclicidade. Outros fatores, como idade do animal, linhagem, estação do ano, além das condições de alimentação e luminosidade podem provocar modificações no ciclo estral (BANKS, 1992; SANTOS, 2002).

Contudo, destaca-se que esta técnica é de fácil utilização para identificação das fases do ciclo estral de ratas, além de ser considerada menos invasiva e apresentar menores custos, quando comparada a dosagem hormonal no soro dos animais. Apesar disso, Becker et al. (2005), ressaltam que deve-se ter certos cuidados ao utilizar-se da técnica do esfregaço vaginal, para evitar, por exemplo, a estimulação do colo uterino, evitando-se assim, induzir a pseudoprenhez, perturbando desta maneira, o ciclo estral da rata.

Apesar da correlação de 66,66% entre as técnicas analisadas neste estudo, destaca-se a necessidade de ampliação dos estudos desta técnica para determinação das fases do ciclo estral de ratas, assim como sua padronização e validação, em especial no que diz respeito aos intervalos de coleta e contagem de células

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme os resultados das dosagens séricas 17- $\beta$  estradiol e posterior comparação com os resultados obtidos através das análises

microscópicas das lâminas de esfregaços vaginais, observou-se que os resultados obtidos em ambos os procedimentos foram compatíveis em relação a frequência de fases em 66,66%. Porém, ressalta-se a necessidade de maiores estudos desta natureza, em especial com acompanhamentos e coletas em intervalos menores que 24 horas, para que assim possa-se dar continuidade e maior profundidade às discussões aqui apresentadas e, que venham a agregar mais dados aos obtidos nesta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.
- BECKER, J.B.; ARNOLD, A.P; BERKLEY, K.J.; BLAUSTEIN, J.D.; ECKEL L.A.; HAMPSON E. Strategies and Methods for Research on Sex Differences in Brain and Behavior. **Endocrinology**, v.146, n.4, p.1650 –1673, 2005.
- BORILLE, J.M. **Efeito do Resveratrol na Capacidade Fagocítica e na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio de Macrófagos Peritoneais de Ratos Machos e de Fêmeas (Diestro e Proestro)** [Dissertação]. Ponta Grossa: Mestrado - Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva, Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2011.
- CALLEGARI, F.V.R. **Perfil da secreção de progesterona em ratas no proestro: uma nova proposta para o controle do pico pré-ovulatório de LH** [Tese]. Ribeirão Preto: Doutorado - Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2008.
- CARDOZO, M.M. **Padronização da metodologia para obtenção de deciduoma em ratas (*Rattus norvegicus*, var, *Wistar*)** [Monografia]. Curitiba: Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná; 2002.
- FONTES, R.F. **Ação central da ocitocina no controle da ingestão alimentar: influência do ciclo estral** [Dissertação]. Aracaju: Pós – graduação em Medicina, Universidade Estadual de Sergipe; 2012.
- HICKMAN, C.P. et al. **Princípios integrados de zoologia**. 16° Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2016.
- LEITE, R.M.P. **Ciclo estral e menstrual: Repercussão da agressão nutricional precoce sobre parâmetros locomotores em ratas e consequências sobre as propriedades neuromecânicas em mulheres jovens** [Tese]. Recife: Doutorado – Nutrição do centro de ciências da saúde, Universidade Federal de Pernambuco e da Escola de Doutorado da Universidade de Tecnologia de Compiègne; 2008.
- MARCONDES, F.K. **Influenciado ciclo estral sobre as respostas hormonais de ratas submetidas a estresse** [Tese]. São Paulo: Doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas; 1998.
- MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNANO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations- **Braz J Biol.**, v.62, p.609-614, 2002.
- MARTINS, R.R.; PEREIRA, N.M.L.; SILVA, T.M.A. Liquid-base cytology: a new method for o estral cycle study in wistar's rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.20, n.1, p. 01-04, 2005.
- MATTARAIA, V.G.M.; SILVA, A.P.R; SARTORI, D.R.S.; TÁVORA, M.F.C.L.F.; RODRIGUES, U.P.; MOREIRA, V.B. Efeito macho na indução de estro em ratas *wistar* (*Rattus norvegicus*). **Vet. e zootec**, v.16, n.4, p.669-677, 2009.
- MOREIRA, G.V. **Dieta hiperlipídica e envelhecimento modificam a sensibilidade à insulina e a expressão das proteínas relacionadas à via intracelular da insulina em hipotálamo de camundongos fêmeas** [Dissertação]. São Paulo: Departamento de fisiologia e biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.
- NOGUEIRA et al. Determinação da fase do ciclo estral através da anamnese e citolo-

- gia vaginal associada à dosagens hormonais. **Braz. J. Anim. Environ. Res.**, v.2, n.3, p.1037-1045, 2019.
- ORR, R.T. **Biologia dos vertebrados**. 5° Ed. São Paulo: ROCA; 1986.
- SANTOS, Z. A. **Efeitos do Treinamento Intenso e da Restrição Alimentar Sobre o Eixo Reprodutivo de Ratas: Relações com Leptina, Igf-I e Estradiol** [Dissertação]. São Paulo: Mestrado, Universidade São Judas Tadeu; 2006.
- SANTOS, A.V.; FERRAZOLI, M.O. **Ciclo estral nos animais**. Rede veterinária. 2005. Disponível em: <http://www.redevet.com.br/artigos/estral3.htm>. Acesso em: 22 de setembro de 2015.
- SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 114-118. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/sfwtj/16>. Acesso em: 13 maio 2020.
- SIROIS, M. **Medicina de animais de laboratório: princípios e procedimentos**. São Paulo: ROCA; 2007.
- VILELA, M.G.; SANTOS JÚNIOR J.L.; SILVA, J.G.C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **FEMINA**, v.35, n.10, p.667-670, 2007.

*Recebido em: 25 de setembro de 2019.*

*Aceito em: 26 de maio de 2020.*