

IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE CITOLOGIA VAGINAL PARA A IDENTIFICAÇÃO E MONITORIZAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL EM RATAS WISTAR

IMPLANTATION OF VAGINAL CYTOLOGY TECHNIQUE FOR IDENTIFYING AND MONITORING PHASES OF THE ESTROUS CYCLE IN RATAS WISTAR

LA IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE CITOLOGÍA VAGINAL PARA LA IDENTIFICACIÓN Y EL CONTROL DE LAS FASES DEL CICLO ESTRAL EN RATAS WISTAR

Nilce Barril*, Ana Carolina Devito Grisotto**, Ana Carolina Taveira Engler Raiz Coelho**, Gabriela Hamra Pereira**, Juliana Chaves Garcia**

Resumo

Introdução: O ciclo reprodutivo de ratas Wistar, denominado ciclo estral, tem duração de 4 a 5 dias, ocorre no início da puberdade e termina com a senitude, geralmente quando as ratas completam 12 meses, e é didaticamente dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II). A ovulação ocorre no início de proestro até o final do estro; a caracterização de cada fase do ciclo baseia-se na proporção entre três tipos celulares observados no esfregaço vaginal: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos. **Objetivo:** Implantar e padronizar a técnica de citologia vaginal para a identificação e monitorização das fases do ciclo estral em ratas Wistar no biotério das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) da cidade de Catanduva-SP. **Material e Método:** Para tanto foram avaliados os esfregaços vaginais de 10 ratas durante um período de 30 dias. **Resultados:** Em proestro observou-se predomínio de células epiteliais nucleadas, em estro células cornificadas e anucleadas, metaestro apresentou aproximadamente a mesma proporção entre leucócitos, células cornificadas e epiteliais anucleadas e em diestro predomínio de leucócitos. **Conclusão:** O procedimento descrito no presente estudo permitiu a implantação da técnica de citologia vaginal para a identificação e monitorização das fases do ciclo estral em ratas Wistar no biotério da FIPA da cidade de Catanduva-SP e o início de linha de pesquisa envolvendo ensaios sobre a ação teratogênica através do projeto intitulado "Avaliação da toxicidade materna e fetal em ratas Wistar tratadas com chá verde (*Camellia sinensis*) durante a prenhez".

Palavras-chave: Ciclo estral. Esfregaço vaginal. Ratas Wistar.

Abstract

Introduction: The reproductive cycle of Wistar female rats, called estrous cycle lasts from 4 to 5 days, occurs early in puberty and ends with senitude, usually when the female rats complete 12 months and is didactically divided into four phases: proestrus, estrus, metaestrus (or diestrus I) and diestrus (or diestrus II). Ovulation occurs in early proestrus until the end of the estrus cycle; the characterization of each phase is based on the ratio of three cell types observed in vaginal smear: epithelial cells, keratinized cells and leukocytes. **Objective:** To implement and standardize the vaginal cytology technique for identifying and monitoring the phases of the estrous cycle in female rats at the vivarium of the Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) in the city of Catanduva-SP. **Material and Method:** Therefore, we evaluated the vaginal smears of 10 rats over a period of 30 days. **Results:** In proestro there was a predominance of nucleated epithelial cells, while in estrus a predominance of cornified and anuclear cells. During metaestrus there was approximately the same proportion of leukocytes, cornified and anucleated epithelial cells, while during diestro there was a predominance of leukocytes. **Conclusion:** The procedure described in this study allowed the implantation of vaginal cytology technique for identifying and monitoring the phases of the estrous cycle in female rats at the vivarium of the FIPA in the city of Catanduva-SP and the beginning of the research line involving tests on teratogenicity action through the project entitled "Evaluation of maternal and fetal toxicity in wistar female rats treated with green tea (*Camellia sinensis*) during pregnancy".

Keywords: Estrous cycle. Vaginal smears. Rats Wistar.

Resumen

Introducción: El ciclo reproductivo de las ratas Wistar, llamado ciclo estral dura de 4 a 5 días ocurre al comienzo de la pubertad y termina con senitude, por lo general cuando las ratas completan 12 meses y se divide en cuatro fases didáctica: proestro, estro, metaestro (o diestro I) y el diestro (o diestro II). La ovulación se produce en proestro temprano para el final de las características del ciclo de estro de cada fase en base a la relación de los tres tipos de células observadas en frotis vaginal: células epiteliales, células queratinizadas y leucocitos. **Objetivo:** Implementar y estandarizar la técnica de citología vaginal para la identificación y seguimiento de las fases del ciclo estral en ratas Wistar en el vivero de las Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) en la ciudad de Catanduva-SP. **Material y Método:** Por lo tanto, se evaluaron las muestras vaginales de 10 ratas durante un periodo de 30 días. **Resultados:** En proestro hubo un predominio de células epiteliales nucleadas en las células del estro cornified y sin núcleo, metaestro aproximadamente mostraron la misma proporción de glóbulos blancos, glóbulos cornified y epiteliales sin núcleos y predominio de leucócitos diestro. **Conclusión:** El procedimiento descrito en este estudio permitió la implantación de la técnica de citología vaginal para la identificación y seguimiento de las fases del ciclo estral en ratas Wistars en el vivero de la FIPA en la ciudad de Catanduva-SP y la línea de búsqueda que comienza sobre ensayos con la acción teratogenicidad a través del proyecto titulado "Evaluación de latoxicidad materna y fetal en ratas Wistar tratadas con té verde (*Camellia sinensis*) durante el embarazo".

Palabras clave: Ciclo estral. Frotis vaginal. Ratas Wistar.

* Doutora em Genética pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP-São José do Rio Preto-SP), docente da disciplina de Genética Humana do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Responsável pelo Laboratório de Citogenética Humana e Ambulatório de Aconselhamento Genético do Hospital Emílio Carlos das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP. Contato: medicinailce@gmail.com

** Graduandos do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

INTRODUÇÃO

A puberdade em ratas Wistar corresponde ao período de crescimento e maturação dos oócitos nos ovários, culminando no primeiro ciclo reprodutivo, e ocorre de um a dois dias após a abertura do canal vaginal que, por sua vez, se dá entre o 280 e o 490 dia de vida¹.

O ciclo reprodutivo destes animais, denominado ciclo estral, tem duração de 4 a 5 dias, ocorre no início da puberdade e termina com a senitude, geralmente quando as ratas completam 12 meses, e é didaticamente dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II). A ovulação ocorre no início de proestro até o final do estro; a caracterização de cada fase do ciclo baseia-se na proporção entre três tipos celulares observados no esfregaço vaginal: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos^{1,2}.

Durante a fase proestro os níveis de LH, prolactina e FSH permanecem baixos e aumentam no final do proestro. O estradiol começa a aumentar em metaestro, atingindo seu pico máximo durante o proestro, retornando aos níveis basais na fase estro. A secreção de progesterona também aumenta durante o metaestro e diestro com redução posterior, quando os valores de progesterona sobem para alcançar o seu segundo pico no final do proestro³.

A identificação das fases do ciclo estral é realizada através da observação do esfregaço vaginal. Proestro é caracterizada por um grande número de células redondas, polinucleadas que se apresentam dispersas ou agrupadas. Em estro o esfregaço vaginal evidencia a presença de células queratinizadas e anucleadas. Em metaestro são visualizados inúmeros leucócitos e filamentos de muco e em diestro a mucosa vaginal é fina com poucos leucócitos, algumas células queratinizadas e muco⁴.

O monitoramento do ciclo estral permite a realização de ensaios sobre aspectos do ciclo reprodutivo, a influência de fatores ambientais sobre a reprodução e a ação de substâncias potencialmente teratogênicas sobre a progênie.

OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi implantar e padronizar a técnica de citologia vaginal para a identificação e monitorização das fases do ciclo estral em ratas Wistar no biotério das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA)

da cidade de Catanduva-SP.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas 20 ratas Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*), com três meses de idade, pesando 200 a 300g. Durante o experimento, os animais permaneceram em gaiolas de polietileno, dois por gaiola, mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 a 25^o C) sob condição constante de umidade (50% ± 5) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração comercial Nuvilab® CR1 Nuvital Nutrientes S/A, Brazil, e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram realizados na Unidade Didática de Pesquisa Experimental (UDPE) da FIPA.

A coleta do lavado vaginal foi realizada com uso de pipeta Pasteur contendo 0,5 mL de solução salina de cloreto de sódio a 0,9%. A ponta da pipeta foi introduzida no orifício vaginal do animal, uma gota da solução salina foi coletada, aspirada e gotejada em lâminas de vidro.

Durante 30 dias, todas as manhãs, entre 9 e 10 horas foi realizada coleta de lavado vaginal e observação do esfregaço vaginal em microscópio óptico comum sem uso de condensador (campo escuro), em aumentos de 10 e 40 vezes. A coleta foi realizada diariamente por 30 dias, sempre no mesmo horário para assegurar a regularidade do ciclo antes do início da realização do experimento.

Três tipos de células foram identificados: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos, possibilitando o reconhecimento da fase do ciclo estral de cada animal.

Os ciclos foram considerados irregulares quando se mantinham na mesma fase durante 4-5 dias ou quando não era observada a sequência proestro, estro, metaestro e diestro (ou intermediários) entre as fases.

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - FIPA), através do protocolo nº. 150424-03.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A duração média do ciclo estral foi 4-5 dias para 65%-70% das ratas. Entretanto, alguns animais apresentaram ciclos mais regulares, dados concordantes com a literatura consultada⁵⁻⁷.

De um modo geral, alguns ratos apresentam maior agressividade nas fases iniciais das coletas da secreção vaginal. Entretanto, após a primeira semana os animais

mostraram-se menos agressivos, provavelmente por habituarem-se aos procedimentos de coleta. Ressaltamos que, diante do comportamento observado nos primeiros dias de manipulação dos animais, os experimentos envolvendo o monitoramento das fases do ciclo devem ser iniciados após o décimo dia de coleta a fim de evitar que o estresse resultante da manipulação não influencie nos resultados experimentais⁷.

O procedimento descrito no presente estudo

permitiu a implantação da técnica de citologia vaginal para a identificação e monitorização das fases do ciclo estral em ratas Wistar no biotério das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) da cidade de Catanduva-SP e o início de linha de pesquisa envolvendo ensaios sobre a ação teratogênica através do projeto intitulado "Avaliação da toxicidade materna e fetal em ratas Wistar tratadas com chá verde (*Camellia sinensis*) durante a prenhez".

REFERÊNCIAS

1. Spornitz UM, Socin CD, Dravid AA. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *Anat Rec.* 1999 Jan; 254(1):116-26.
2. Allen E. The proestrous cycle in the mouse. *Am J Anat.* 1922; 30:297-347.
3. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002; 62(4):609-14.
4. Vilela MG, Santos Júnior JL, Castro-Silva JG. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *Femina.* 2007; 35(10):667-70.
5. Tanno AC, Bianchi FJ, Marcondes FK. Influência do ciclo estral sobre a sensibilidade da resposta cronotrópica à norepinefrina em ratas submetidas a estresse agudo. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2002; 38(1):63-70.
6. Marcondes FK, Miguel K, Melo LL, Spadari-Bratfisch, RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiol Behav.* 2001; 74(4-5):435-40.
7. Lehmann ML, Erskine MS. Induction of pseudo pregnancy using VCS: importance of lordosis intensity and prestimulus estrous cycle length. *Horm Behav.* 2004; 45(2):75-83.

Recebido em: 15/02/2016

Aceito em: 13/08/2016