

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**CRISTALIZAÇÃO SALIVAR E CITOLOGIA VAGINAL DE OVELHAS
SUBMETIDAS À INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO**

Autora: Andressa Silveira Gonçalves

PORTO ALEGRE

2017/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**CRISTALIZAÇÃO SALIVAR E CITOLOGIA VAGINAL DE OVELHAS
SUBMETIDAS À INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO**

Autora: Andressa Silveira Gonçalves

**Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária
como requisito parcial para a obtenção da graduação
em Medicina Veterinária**

**Orientadora: Profª. Dra. Raquel Fraga S. Raimondo
Coorientadora: Profª. Dra. Enefer R. Oberst**

PORTO ALEGRE

2017/1

Dedico este trabalho aos meus pais Eduardo Cunha Gonçalves e Nelly de Souza Silveira que me deram todo o apoio durante a graduação tornando possível a realização do meu objetivo e do meu sonho, possuir um curso superior e me tornar médica veterinária.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades que me foram ofertadas e pelas quais tenho muito orgulho de ter escolhido. Além disso, por ter colocado pessoas muito especiais no meu caminho, pois elas tornaram essa caminhada muito mais divertida, proveitosa e saborosa.

À minha mãe Nelly, começo dizendo em maiúsculo duas palavras, MUITO OBRIGADA. Embora eu saiba que não são nem um terço do que ela merece pelos 30 anos de dedicação que tens por mim, por estar sempre presente em todos os momentos e principalmente pelas palavras confortantes, almoços diários, agrados e tantas outras atitudes feitas sempre com muito carinho.

Ao meu pai Eduardo, que apesar de não ter curtido muito a ideia da troca de profissão no início do curso, acabou me apoiando, e esteve sempre presente e disponível para me ajudar durante esses longos anos. Afinal a pergunta que eu mais ouvi foi, “quando tu te forma mesmo filha?” A resposta tá aí, já tem data e hora marcada, dia 9 de dezembro de 2017.

À minha irmã Bianca, que aguentou todos os “nãos” porque tinha prova, trabalho ou plantão na hora dos convites de mates, viagens, festas, almoços de domingo e sempre entendeu e me apoiou no meu objetivo.

Aos meus padrinhos que me apoiaram desde o início, principalmente o meu dindo Vassílios querido, sempre presente com suas sábias palavras de carinho e admiração.

À minha amiga de infância Cássia, que já formada em veterinária, juntamente com a sua mãe tia Bene (que foi minha segunda mãe em Santa Maria), me receberam com tanto carinho em sua casa, cidade onde se situa a Universidade Federal de Santa Maria, pela qual iniciei a graduação do curso.

Aos meus colegas e amigos Douglas e Luiza, que tive o prazer de conhecer ao longo desta caminhada e fizeram parte dos momentos de coleguismo, companheirismo e amizade, tornando a minha estada em Santa Maria muito mais alegre e cheia de histórias para contar.

Ao patrocinador Márcio, da Agener que, com grande disposição doou os implantes e os hormônios utilizados nos protocolos feitos nos três experimentos, tornando-os possíveis.

Ao parceiro Felipe, proprietário da Fazenda Maria Cita, que colocou à disposição 29 ovelhas para a execução de uma parte do experimento e doou algumas doses de sêmen para a realização da Inseminação Artificial.

As minhas filhas amadas, as ovelhas, principalmente a 22, a 38 e o 108, que fizeram parte deste experimento doando com muito gosto as suas “babinhas” e o que fosse necessário sempre com muita disposição e amor, pois sem elas nada disso seria possível.

À toda a equipe do grupo RuminAção, principalmente a colega Brenda que participou de várias etapas do experimento e fez a leitura de todas as lâminas da citologia, tendo que estudar para isso e muitas vezes com o tempo corrido, assumiu com muita disposição e bom humor incríveis que só ela tem, essa parte do estudo.

À profe Ender, da disciplina de Inseminação Artificial, por toda a ajuda, empenho, estudo, ensinamentos e companheirismo durante todos os experimentos, pois esteve presente do início ao fim, desde as coletas até a leitura e interpretação das lâminas, sempre disposta a ajudar e com muitas ideias e palavras impressionantes.

À professora Raquel, que foi profe, orientadora (já perdi a conta de quantas vezes) e amiga. Sempre “INCANSÁVEL”, essa também merece letra maiúscula, pois me deu todo o suporte e ajuda em todos os experimentos, e em todas as suas partes. Juntamente com a professora Ender e suas ideias mirabolantes, fizeram toda a pesquisa e criação do experimento que acabou tomando forma e uma certa seriedade ao longo do seu percurso. Participou das coletas, saídas e leituras do experimento sempre com muita disposição, muitas vezes até mais do que eu. Posso dizer que o meu anjo da guarda colocou no meu caminho as melhores orientadora e coorientadora que eu poderia ter nesse TCC. Aguentando o mau humor, as reclamações e os milhares de não vou fazer, sempre com muita paciência e dedicação. Conseguindo a duras penas me ensinar o gostinho de “experimental”, pois a aluna aqui era zero no conhecimento científico. Encabeçou o experimento, que começou “sem pé nem cabeça”, ou melhor “de trás para a frente”, que tinha tudo para dar errado, inclusive porque era o TCC da aluna mais imprevisível, perdida e pateta do grupo, a qual sempre “tudo pode acontecer”... Tivemos momentos para todos os gostos; desde muitas risadas, muitas emoções, muitas palhaçadas, muitas patéticas, até momentos de muita raiva, muito cansaço, muita tristeza e muita dúvida. Enfim, literalmente tudo o que podia acontecer, aconteceu e a previsão então se cumpriu. Porém, o saldo foi positivo, na verdade posso ousar em dizer que foi muito positivo, pois os momentos de alegria e superação superaram todos os outros, que ainda vão continuar fazendo parte da história do experimento, mas serviram para propósitos nobres como o estudo, o treinamento, o conhecimento técnico e científico, e fez com que eu pudesse ver e fazer na prática o que até então, pra mim era só teoria. Além disso, espero que esse ano de trabalho deixe frutos, que possam auxiliar no crescimento e melhoramento do grupo.

Por fim, agradeço a todos os meus familiares, amigos, conhecidos, colegas, professores e os animais que estiveram presentes e ajudaram de alguma forma durante o período da minha graduação e que contribuíram para a execução e realização deste experimento.

RESUMO

As ovelhas apresentam ciclo reprodutivo estacional de dias curtos e associado a isso possuem sinais muito discretos de cio, sendo estes os maiores entraves na cadeia de produção da ovinocultura. A cristalização dos fluidos corporais, principalmente a saliva, vem sendo estudada em várias espécies e se apresenta como uma alternativa simples para a detecção de estro, pois não necessita grande investimento nem profissionais qualificados para sua realização. A citologia vaginal é um método bastante utilizado para a diferenciação das células do epitélio vaginal na detecção de patologias, das fases do estro e já foi descrito para a detecção de prenhes em algumas espécies. Desta forma, no presente trabalho de conclusão de curso foram realizados dois estudos, um que avaliou a cristalização salivar como alternativa para detecção de estro em ovelhas e o outro que avaliou o perfil citológico vaginal de ovelhas submetidas à indução de estro. Para os dois estudos foram avaliadas 11 ovelhas mestiças da raça Corriedale em dois períodos experimentais (primavera e outono) submetidas a protocolos de indução e sincronização de estro. A avaliação do perfil citológico vaginal foi realizada através de esfregaços vaginais observados ao microscópio óptico de luz (200x) para a identificação, classificação e contagem de 100 células por lâmina. Para a avaliação da cristalização salivar foram confeccionados esfregaços com 10uL de saliva que foram observados ao microscópio óptico de luz (200x). O estudo da citologia vaginal de ovelhas submetidas a protocolo curto mostrou que existe diferenciação, dos tipos celulares conforme as fases do ciclo estral. Apesar da predominância de um tipo celular por todo o ciclo e de não existir predominância de um tipo celular em cada fase, a técnica pode auxiliar no controle reprodutivo de ovelhas submetidas a protocolos de indução e sincronização de estro. As formas de cristalização encontradas em ovinos apresentam aumento na quantidade, diversidade, definição e tamanho das folhas conforme se aproxima do período de estro. Podendo ser consideradas como um bom indicador de detecção de estro em ovinos submetidos a protocolos.

Palavras-chave: ovinocultura, manejo reprodutivo, cristalização, citologia.

ABSTRACT

The ewes present a short reproductive seasonal cycle and associated with this have estrus signals very discrete, which are one of the main obstacles in the sheep production chain. The crystallization of body fluids, especially saliva, has been studied in several species and it is presented as a simple alternative for the detection of estrus, since it does not require large investment or qualified professionals to perform it. Vaginal cytology is a widely used method to differentiate the vaginal epithelial cells assisting to detect pathologies, the stages of estrus and has already been described for the detection of pregnancies in some species. Thus, two studies were carried out in this work, one that evaluated salivary crystallization as an alternative for the detection of estrus in sheep and the other that evaluated the vaginal cytological profile of ewes submitted to estrus induction. For the two studies, 11 crossbred Corriedale sheep were evaluated in two experimental periods (spring and autumn), submitted to protocols of induction and estrus synchronization. The evaluation of the vaginal cytologic profile was performed through vaginal smears observed under light microscopy (200x) for the identification, classification and counting of 100 cells per slide. To the Salivary crystallization evaluation were made smears with 10uL of saliva and they were observed under light microscope (200x). The study of the vaginal cytology of sheep submitted to short protocol showed that there are many different types of cells according to the phases of the estrous cycle. Despite the predominance of a cell type throughout the cycle, there is no predominance of a cell type in each phase and the technique can help in the reproductive control of sheep submitted to protocols of estrus induction and synchronization. The forms of crystallization found in sheep present an increase in the quantity, diversity, definition and size of the leaves as the estrus period approaches. It can be considered as a good indicator of estrus detection in sheep submitted to protocols.

Key words: Sheep farming, reproductive management, crystallization, cytology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3	ARTIGO 1: CRISTALIZAÇÃO SALIVAR: UMA ALTERNATIVA PARA DETECÇÃO DE ESTRO EM OVELHAS.....	16
3.1	Resumo.....	16
3.2	Abstract.....	16
3.3	Introdução.....	17
3.4	Materiais e métodos.....	18
3.4.1	Design experimental.....	19
3.4.2	Coleta de saliva e cristalização.....	20
3.4.3	Análise estatística.....	20
3.5	Resultados e discussão.....	20
3.6	Conclusões.....	27
4	ARTIGO 2: PERFIL CITOLÓGICO VAGINAL DE OVELHAS SUBMETIDAS A PROTOCOLOS CURTOS DE INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO.	28
4.1	Resumo.....	28
4.2	Abstract.....	29
4.3	Introdução.....	29
4.4	Materiais e métodos.....	30
4.4.1	Animais e protocolo de indução e sincronização do ciclo estral.....	30
4.4.2	Esfregaços vaginais e avaliação da citologia vaginal.....	31
4.4.3	Análise estatística.....	32
4.5	Resultados e discussão.....	33
4.6	Conclusões.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

Uma das primeiras espécies animais a serem domesticadas, foram os ovinos. Em alguns países como a Austrália, a Nova Zelândia e o Uruguai, a criação destes animais faz parte da cultura e das tradições locais. Ao longo dos anos, a produção de pequenos ruminantes vem se modificando no Brasil. Está havendo uma diferenciação na escolha da aptidão dos animais criados e uma modernização nos modos de produção (MORAES; SOUZA; GONÇALVES, 2002). No Rio Grande do Sul, com um rebanho de aproximadamente quatro milhões de animais, a carne tornou-se o principal produto da criação ovina (IBGE, 2015).

Em decorrência de vários cruzamentos e do desenvolvimento de novas raças, a espécie adquiriu facilidade de adaptação a diferentes climas, e como consequência se obteve um aumento no rebanho nacional, seguido de um maior consumo da carne ovina (MORAES; SOUZA; GONÇALVES, 2002). No entanto, apesar da carne ovina ser considerada um mercado com grandes expectativas principalmente pelas suas qualidades nutritivas e pelo seu sabor peculiar, existem alguns entraves que precisam ser solucionados para alavancar essa atividade comercial: uma produção e fornecimento uniforme e de qualidade para a sua comercialização. Sendo fundamental para se alcançar este objetivo, uma maior produção de cordeiros/ovelha/ano e cordeiros disponíveis para a terminação em todos os meses do ano (HAFEZ, 1995).

Nas regiões temperadas, as fêmeas ovinas são poliéstricas estacionais, ou seja, a sua estação de reprodução varia de acordo com a duração do dia, podendo ter influência também da nutrição e da raça dos animais (BOLAND; CROSBY; CALLACHAN, 1990). Ocorrendo fisiologicamente a estação de monta no outono e a parição na primavera. Além disso, a gestação ovina tem duração média de cinco meses e desmama cordeiros a partir de 45 dias, o que totaliza mais de cinco meses do ano sem produzir. Proporcionando ao produtor gastos diários com alimentação, sanidade, entre outros (FONSECA; SOUZA; BRUSCHI, 2007).

Por consequência desta situação, advém a necessidade de um manejo reprodutivo utilizando técnicas de sincronização de cio que proporcionam aumento da produtividade e na tecnificação do rebanho. Objetivando o controle da reprodução e a sua concentração em épocas preferenciais do ano. Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar a cristalização salivar e a citologia vaginal de ovelhas submetidas à indução e sincronização de estro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

No Rio Grande do Sul é onde se encontra o maior rebanho lanado do país, sendo a ovinocultura representada como uma das principais atividades pecuárias brasileiras (IBGE, 2015). O rebanho conta com aproximadamente quatro milhões de ovinos, e em torno de 69% de todo o rebanho ovino do estado está situado na região da Campanha (ÁVILA *et al.*, 2013).

A carne ovina vem se tornando cada vez mais valorizada, e nos últimos anos surgiram novas perspectivas para essa área. Gerando um mercado bastante exigente, principalmente nos grandes centros consumidores. O consumo de carne ovina atualmente é de 0,7 kg/ano por brasileiro, sendo a quinta carne mais consumida pelos brasileiros (SANTOS *et al.*, 2015). Devido a essa valorização, associada à estabilização no preço da lã, a ovinocultura demonstra ser uma excelente fonte de investimento aos pequenos produtores rurais, e mais uma fonte de renda para os produtores familiares (SANTOS *et al.*, 2015). No entanto, ela ainda está em fase inicial da sua estruturação como atividade econômica, pois necessita de investimentos, padronizações, e principalmente, do combate ao abate clandestino e da produção de animais de qualidade (JUNIOR; RODRIGUES; MORAES, 2010).

Contanto, um dos maiores problemas enfrentados na cadeia produtiva da ovinocultura, é a estacionalidade das fêmeas (MATOS *et al.*, 2015), que afeta diretamente a produção de cordeiros, tornando-a restrita a um determinado período do ano. Os ciclos desses animais, caracterizados como poliéstricos estacionais de dias curtos, ocorrem no verão e no outono, e o anestro durante o restante do ano (RODRIGUES; SASA, 2010). Por isso a importância de diminuir ao máximo este período não produtivo, através de protocolos de indução e sincronização de cios, que podem proporcionar um aumento no número de partos e consequentemente na produção de cordeiros. Tornando essa atividade mais rentável aos produtores que poderão oferecer cordeiros ao mercado durante o ano todo.

A estação reprodutiva das ovelhas, também pode variar de acordo com a região em que são criadas. Elas podem até representar ciclicidade durante o ano inteiro, como é o caso da região nordeste. Já na região sul, o período reprodutivo das raças originárias de clima temperado, se restringe ao outono, enquanto que na região sudeste o período da reprodução perdura até o inverno. Raças de clima tropical, como a Santa Inês, na região sudeste apresentam estro durante todo o ano (RODRIGUES; SASA, 2010).

As mudanças de fotoperíodo (horas de luz e horas de escuridão) são percebidas através da retina. Após esta percepção são traduzidas em sinais nervosos e transmitidas à glândula pineal, que responde secretando a melatonina imediatamente depois do período de noite se

mantendo até o início da luz, gerando picos de secreção hormonal. Ao atuar no centro hipotalâmico, a melatonina determina a resposta dos centros de liberação tônicas e pré-ovulatórias de GnRH (CASTILLO *et al.*, 2007). O GnRH atua estimulando a adenohipófise na síntese e liberação dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). Os ovários sob ação dos dois hormônios iniciará a esteroidogênese da progesterona e do estrogênio que atuarão em conjunto no desenvolvimento folicular e na ovulação (MORELLO; CHEMINEAU, 2008).

O ciclo estral das ovelhas compreende quatro fases, o proestro, o estro, o metaestro e o diestro, geralmente apresentando duração de 16 a 17 dias, sendo um pouco mais curto nas borregas. A duração do proestro varia de dois a três dias, o estro 24 a 36 horas, em média 38 horas. O metaestro, não é uma fase muito bem definida, mas pode durar de dois a três dias. O diestro é a fase mais longa com duração média de 10 dias. (PORTO *et al.*, 2007). A ovulação ocorre, na maioria das ovelhas, no terço final do estro, entre 25 a 30 horas após o seu início (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A estação reprodutiva desta espécie pode ser controlada por vários métodos desenvolvidos atualmente. Alguns deles envolvem a administração de hormônios exógenos que modificam a fisiologia do ciclo estral natural das ovelhas. E outros “métodos naturais”, sem a administração de hormônios, como o controle das horas de luz e o efeito macho, também podem ser úteis (ABECIA; GONZÁLES-BULNES, 2012).

A indução e a sincronização do estro permite concentrar os nascimentos nos períodos mais propícios do ano, e a formação de lotes mais homogêneos de animais (BANDEIRA *et al.*, 2004). Utilizadas durante o anestro e a sua transição, as técnicas podem de forma isolada ou em associação induzir ao estro que poderá ser ou não de forma sincronizada, a fim de concentrar os trabalhos (FONSECA; SOUZA; BRUSCHI, 2007).

A administração de hormônios, como a progesterona ou os seus análogos (progestágenos) e prostaglandinas, irá modificar a fase luteal do ciclo, enquanto a melatonina, que controla o ciclo fisiológico anual, age na percepção da diminuição do fotoperíodo (ABECIA; FORCADA; GONZÁLES-BULNES, 2012).

O tratamento hormonal mais comumente utilizado para a indução do estro consiste na utilização de acetato de medroxiprogesterona (MAP). Após a remoção da esponja aplica-se uma injeção intramuscular de gonadotrofina (MACHADO; SIMPLÍCIO, 2001). Os dispositivos são confeccionados com esponjas de alta densidade, impregnados com 50mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou 40mg de fluoroacetato de progesterona (FGA), e quando introduzidos no fundo da vagina, liberam o progestágeno lentamente (GONÇALVES;

FIGUEIREDO; FREITAS, 2002). Há no mercado também um dispositivo interno feito de silicone de liberação de drogas composto de 0,4g de progesterona natural (KNIGHTS *et al.*, 2001). A sua forma de utilização é semelhante à esponja de progestágeno, porém este possui um custo maior, mas permite ser reutilizado.

Nos protocolos de reprodução, os dispositivos vaginais são normalmente associados à prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) e à gonadotrofina coriônica equina (eCG), conforme o protocolo utilizado e o estágio do ciclo da fêmea. A duração do tempo de permanência do dispositivo e a seleção dos hormônios atualmente ainda é muito variável, depende do programa de sincronização escolhido. Geralmente, os protocolos com finalidade de sincronização de estro variam de 12 a 14 dias de uso do implante vaginal. Embora, alguns estudos sobre o acompanhamento da dinâmica folicular ovina e das suas características fisiológicas reprodutivas, já estejam apontando dúvidas em relação à necessidade de tanto tempo de exposição ao dispositivo (MENCHACA; RUBIANES, 2004).

Os tratamentos longos (12 a 14 dias) têm proporcionado altas taxas de ciclicidade, mas a fertilidade apresentada é baixa, comparada a um ciclo fisiológico normal. Por isso, vêm se estudando os tratamentos curtos, que correspondem ao uso de cinco a seis dias com diferentes tipos de progestágenos, fora da estação de monta, com resultados satisfatórios na indução de estro e apresentando altas taxas de fertilidade. Concluindo-se que as baixas taxas de prenhes obtidas nos protocolos longos está relacionada a um recrutamento folicular lento que promove a ovulação de folículos dominantes mais velhos, já nos protocolos curtos as altas taxas de prenhes foram relacionadas provavelmente, devido a ovulação de folículos novos recrutados mais recentemente (VINOLES *et al.*, 2001).

Além da estacionalidade, outro entrave é que a duração do estro é de curta e os sinais apresentados pelas ovelhas são bem menos evidentes que em outras espécies de ruminantes. Com a presença do macho, geralmente as ovelhas irão procurá-lo e segui-lo, abanando a cauda e ficando imóveis na hora da monta. Se o macho estiver ausente ou for inexperiente, o estro pode até não ser detectado (CASTILHO *et al.*, 2007).

A citologia vaginal esfoliativa pode ser utilizada em várias espécies, pois é um indicador sensível das mudanças que ocorrem ao longo do ciclo estral. Tais mudanças, em algumas situações, servem de diagnóstico auxiliar confiável para determinar qual o período reprodutivo e o momento ótimo para a realização da cobertura ou da inseminação artificial (REZENDE, 2006). Compreende o estudo das células naturalmente descamadas ou retiradas artificialmente da superfície dos tecidos (RAPOSO, *et al.*, 1999), sendo um método rápido, barato e bastante simples. Utilizada comumente para determinar as fases do ciclo estral em

cadelas e gatas com o objetivo de saber o melhor momento para a realização da cópula ou da inseminação artificial.

Já foram feitas pesquisas em ursos pandas, leões africanos, caititus, tamanduás e cachorro-do-mato, com a finalidade de observar o aparecimento de um mesmo padrão citológico verificado em cães e gatos e para poder realizar a reprodução assistida *ex situ* no momento certo destas espécies (SNOECK; DA CRUZ; CATENACCI, 2010).

O epitélio vaginal é constituído por diferentes camadas morfologicamente e a sua alteração se dá devido ao estímulo hormonal predominante de cada período do ciclo, os quais são identificados com o auxílio de colorações histológicas apropriadas (RIBEIRO *et al.*, 2012). As células do epitélio vaginal são classificadas como parabasais, intermediárias, intermediárias superficiais e superficiais. Nos mamíferos, a descamação do epitélio e a cornificação das células é causada pela atividade estrogênica. Algumas mudanças fisiológicas reprodutivas como a gestação e ou o período pós-parto apresentam diferentes concentrações hormonais de progesterona e estrógeno, que também podem ser verificadas através da citologia vaginal. Inclusive mudanças ocorridas por inflamações que acometem o trato genital irão aparecer na citologia (SHARMA; SHARMA, 2016).

Outros métodos de detecção de estro, como a cristalização de alguns fluídos corporais, foi primeiramente identificada no muco cervical e tem sido relacionada com o período reprodutivo há mais de 60 anos na espécie humana. Posteriormente a cristalização salivar foi descrita para auxiliar na análise do período fértil e na detecção da gestação, também em humanos. Alguns autores atribuem as mudanças na cristalização salivar durante o ciclo reprodutivo, às mudanças nas concentrações hormonais ocorridas neste período, principalmente do estrógeno. Eles descrevem este hormônio como sendo o responsável pela ascensão dos eletrólitos, os formadores necessários dos cristais (KUBÁTOVÁ; FEDOROVA, 2016).

A cristalização do tipo samambaia já foi descrita através do muco cervical, do muco nasal, da secreção salivar, da secreção lacrimal e do colostro, enquanto que o padrão salivar vem sendo o mais amplamente utilizado (SANGEETHA; RAMESHKUMAR, 2015).

A cristalização salivar compreende o estudo do padrão de cristalização de samambaia salivar, atualmente já relatado em várias espécies de animais domésticos (RAVINDER, *et al.*, 2016). Dentre estas espécies podemos citar bovinos, bubalinos, camelos, caninos (RAVINDER, *et al.*, 2016) e ovinos (SANGEETHA; RAMESHKUMAR, 2015).

O padrão de cristalização pode ser classificado de diferentes formas. A primeira classificação, utilizada principalmente em estudos com humanos, diferencia a cristalização em

típica de dias não férteis, do período de transição e dos dias férteis. A segunda classificação é feita de acordo com tipo de cristalização encontrada – nenhuma (none), tipo-ramo (branch-like), tipo-abeto (fir-like), tipo-samambaia (fern-like) e as suas combinações, utilizada em bovinos (KUBÁTOVÁ; FEDOROVA, 2016).

A cristalização do tipo samambaia já foi descrita também através do muco cervical, do muco nasal, da secreção salivar, da secreção lacrimal e do colostro, enquanto que o padrão salivar vem sendo o mais amplamente utilizado (SANGEETHA; RAMESHKUMAR, 2015).

Em ovinos existem poucos estudos da utilização da cristalização salivar, em búfalas, também com ciclicidade estacional, se mostrou ser uma boa ferramenta para a detecção de estro, devido aos pouquíssimos sinais de cio apresentados nesta espécie e a simplicidade de execução do método (RAVINDER, *et al.*, 2016). Podendo ser facilmente utilizada também em ovinos por ser uma espécie com certa semelhança, principalmente pela sua falta de sinais marcantes de cio e também por ser um método simples que não necessita de equipamentos caros, podendo ser executado facilmente a campo.

3 ARTIGO CIENTÍFICO 1: CRISTALIZAÇÃO SALIVAR: UMA ALTERNATIVA PARA DETECÇÃO DE ESTRO EM OVELHAS

3.1 Resumo

A cristalização dos fluidos corporais, principalmente a saliva, vem sendo estudada em várias espécies e se apresenta como uma alternativa simples para a detecção de estro, pois não necessita grande investimento nem profissionais qualificados para sua realização. Os discretos sinais de estro apresentados pelos ovinos, associados ao período reprodutivo estacional são responsáveis pela maior parte dos prejuízos econômicos relacionados com a reprodução da espécie. Por isso, novas alternativas de detecção de estro são essenciais para diminuir tais perdas. Desta forma, nosso estudo avaliou a cristalização salivar como alternativa para detecção de estro em ovelhas. Foram avaliadas 11 ovelhas mestiças da raça Corriedale em dois períodos experimentais (primavera e outono) submetidas a protocolos de indução e sincronização de estro. A coleta de saliva foi realizada em seis momentos referentes às fases do ciclo estral conforme protocolo utilizado. Esfregaços com 10uL de saliva foram observados ao microscópio óptico de luz (200x) para a avaliação da cristalização salivar. As formas de cristalização encontradas em ovinos apresentam aumento na quantidade, diversidade, definição e tamanho das folhas conforme se aproxima do período de estro. Podendo ser consideradas como um bom indicador de detecção de estro em ovinos submetidos a protocolos.

Palavras-chave: ovinos, protocolos de indução e sincronização de estro, anestro, reprodução.

3.2 Abstract

The body fluids crystallization, mostly saliva, has been studied in many species and presents itself as a simple alternative to estrus detection, since it does not require great investment or qualified professionals to be performed. The discreet estrus signs presented by sheep, associated to the seasonal reproductive period are responsible for most of the economic losses related to the specie reproduction. Therefore, new alternatives to estrus detection are essential to reduce such losses. Thus, our study evaluated the salivary crystallization as an alternative to estrus detection in ewes. We evaluated 11 crossbreed ewes of Corriedale at 2 different experimental moments (spring and autumn), submitted to estrus induction and

synchronization protocols. The saliva collection was performed in six moments referring to the estrus phases corresponding to protocol used. Saliva smears with 10uL, were observed to the optical light microscope (200x) for evaluation of salivary crystallization. The crystallization shapes found in sheep showed increase in the amount, diversity, definition and size of the leaves as the estrus period approaches and can be considered as a fair indicator to estrus detection in sheep submitted to protocols.

Key words:. sheep, induction and synchronization protocols, anestrous, reproduction.

3.3 Introdução

O ciclo de reprodução pode ser sazonal em algumas espécies de ruminantes, na espécie ovina, a sazonalidade é relacionada ao fotoperíodo negativo e a estação reprodutiva normalmente começa no final do verão e no início do outono, em resposta a diminuição da luminosidade. O período de anestro abrange o final do inverno e início da primavera. Essa situação afeta diretamente a produção de cordeiros, tornando-a restrita a um determinado período do ano. Além da estacionalidade, outro entrave é a duração do estro, em média 38 horas, e os sinais apresentados pelas ovelhas são menos evidentes que em outras espécies de ruminantes. Com o avanço das biotécnicas aplicadas à reprodução ocorreu a maximização da eficiência reprodutiva em ovinos, contudo é necessária a busca por métodos auxiliares para a detecção das fases do ciclo estral.

A utilização da cristalização pela presença do estrógeno em fluidos corporais primeiramente identificadas no muco cervical tem sido relacionada com o período reprodutivo há mais de 60 anos na espécie humana. Podemos definir cristalização como sendo o processo através do qual um componente de uma solução líquida muda para a sua fase sólida, tendendo a se separar da solução e a precipitar sob a forma de cristais (WEBER, 1991). As secreções biológicas capazes de cristalizar contém mucoproteínas, por exemplo, mucinas, ou outros compostos orgânicos e eletrólitos, especialmente sais, tais como NaCl, KCl e CaCl₂ (TSILIGIANNI *et al.*, 2001).

Inicialmente, quem relatou a cristalização do muco cervical foi Papanicolau (1946), relacionando os arranjos de samambaia observados no muco das mulheres como sugestivo fenômeno que poderia ser usado como um preditor da ovulação. As mudanças associadas com a cristalização têm relação com a secreção de estrógeno e progesterona, enquanto o estrógeno favorece a cristalização, a progesterona inibe (PARDO-CARMONA *et al.*, 2010). Em

bovinos a cristalização no muco cervical sofre modificações durante todo o ciclo, com a presença do padrão de samambaia no estro e a sua ausência nas outras fases do ciclo (GNANAMUTHU; RAMESHKUMAR, 2015). As formas cristalinas que são observadas têm sido chamadas de "arborização" ou "fenômeno de samambaia" (KUBÁTOVÁ; FEDOROVA, 2016). A cristalização do tipo samambaia já foi descrita no muco cervical, muco nasal, secreção salivar, secreção lacrimal e no colostro, enquanto que o padrão salivar vem sendo o mais amplamente utilizado.

O uso da saliva para avaliação dos padrões de cristalização relacionados ao ciclo estral é menos invasivo quando comparado à coleta de muco cervical. As mudanças na cristalização salivar durante o ciclo reprodutivo são relacionadas com alterações nas concentrações hormonais ocorridas neste período, principalmente do estrógeno, responsável pela ascensão dos eletrólitos que formam os cristais (KUBÁTOVÁ; FEDOROVA, 2016).

Atualmente a cristalização vem sendo descrita também em outras espécies, como a canina (PARDO-CARMONA *et al.*, 2010), a bovina (SKALOVA; FEDOROVA; BRANDLOVA, 2013; GNANAMUTHU; RAMESHKUMAR, 2015), os primatas (KUBÁTOVÁ; FEDOROVA, 2016), os camelídeos (HABEROVÁ, 2010), os bubalinos (RAVINDER *et al.*, 2016) e os ovinos (SANGEETHA; RAMESHKUMAR, 2015). Para tanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as formas de cristalização salivar de ovelhas submetidas a protocolos de indução e sincronização de estro.

3.4 Materiais e métodos

Os procedimentos envolvendo os animais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no projeto 32772.

3.4.1 Design experimental

O estudo foi conduzido na unidade de criação de ovinos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizada na cidade de Porto Alegre, RS, Sul do Brasil (30°01'40"S, 51°13'43"W). Um total de 11 ovelhas mestiças da raça Corriedale foram avaliadas em dois períodos experimentais: Primavera - 01 de novembro a 13 de novembro de 2016 e outono - 31 de março a 12 de abril de 2017. As ovelhas foram mantidas

em piquete de campo nativo melhorado com pastagem cultivada de milheto (*Pennisetum americanum*) e capim aruana (*Panicum Maximum*) com água à vontade.

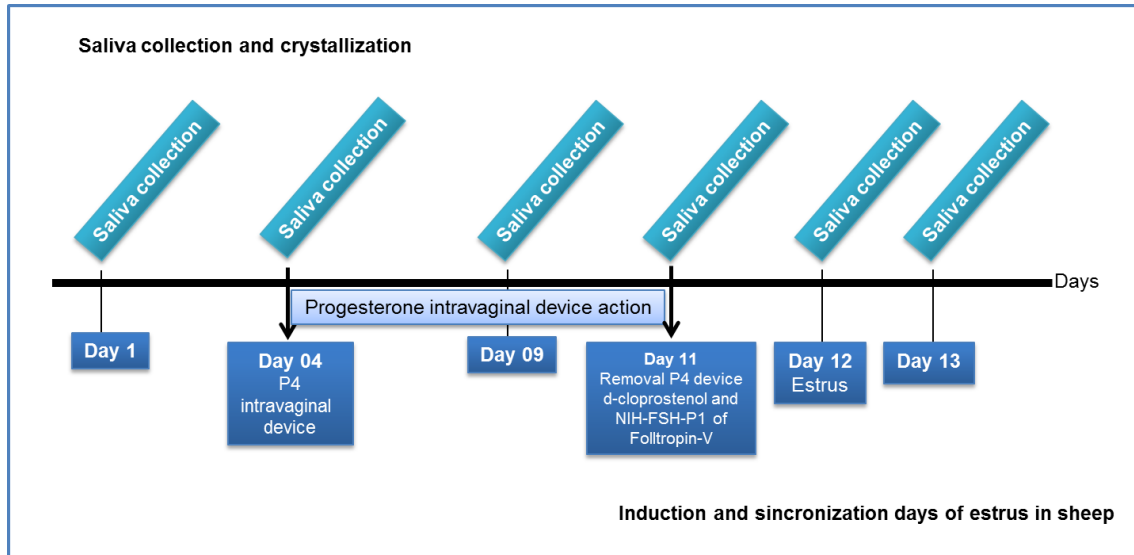
Com a finalidade de se igualar as fases do ciclo estral e estimar o dia do estro, as ovelhas foram submetidas a protocolo curto de indução e sincronização de estro realizados fora da estação reprodutiva (primavera) e na estação reprodutiva (outono). Em fase aleatória do ciclo estral (dia 0), cada ovelha recebeu um dispositivo intravaginal (Primer®, Tecnopec, Brasil) impregnado com 0,36g de progesterona por sete dias. A colocação do dispositivo foi realizada conforme instruções do fabricante com o auxílio de um aplicador específico. No dia da retirada do dispositivo, dia 7, as ovelhas receberam 0,0375 mg de D-Cloprostenol (Prolise®, Tecnopec, Brasil) e 10mg de Foltropina de pituitária suína (NIH-FSH-P1 of Folltropin-V - Folltropin®, Tecnopec, Brasil) por via intramuscular.

3.4.2 Coleta de saliva e cristalização

A coleta de saliva foi realizada em seis momentos durante os períodos experimentais: Dia 1: -3 dias da colocação do implante; Dia 4: dia da colocação do implante; Dia 9: 5 dias após a colocação do implante; Dia 11: dia da retirada do implante e aplicação dos hormônios; Dia 12: 24 horas após a retirada do implante (provável estro) e Dia 13: 48 horas após a retirada do implante (Figura 1).

As ovelhas foram contidas e uma atadura de gaze foi utilizada para evitar a abertura da boca e promover o acúmulo de saliva, que foi coletada com pipeta Pasteur descartável, introduzida na comissura labial. A coleta de saliva foi realizada todos os dias em torno das 13:30 horas. A saliva coletada foi armazenada em microtubos e mantida refrigerada até a decantação para remover qualquer partícula de alimento, sujeira ou células. Foram utilizados 10µL do sobrenadante da saliva para confeccionar esfregaço com movimentos circulares da gota depositada na lâmina de vidro. Em seguida, os esfregaços foram devidamente identificados e secos a 39°C, em mesa térmica para fixação e foram observados ao microscópio óptico de luz (Microscópio Olympus CX 40) com aumentos de 200x para a classificação da cristalização salivar, utilizando-se um padrão adaptado de Ravinder *et al.*; (2016). A cristalização salivar foi classificada em escores de 0 a 3 baseada na quantidade de cristalização observada na lâmina, levando em consideração o preenchimento do campo de observação (x200) e também o tipo de desenho de arborização observado, sendo: Escore 0: sem cristalização; Escore 1: muito pouca cristalização; Escore 2: pouca cristalização; Escore 3 muita cristalização.

Figura 1. Linha do tempo das coletas das amostras durante os dias de protocolo de indução e sincronização de estro nos dois períodos experimentais, primavera e outono, para avaliação do padrão de cristalização salivar em ovelhas.



Fonte: Próprio autor

3.4.3 Análise estatística

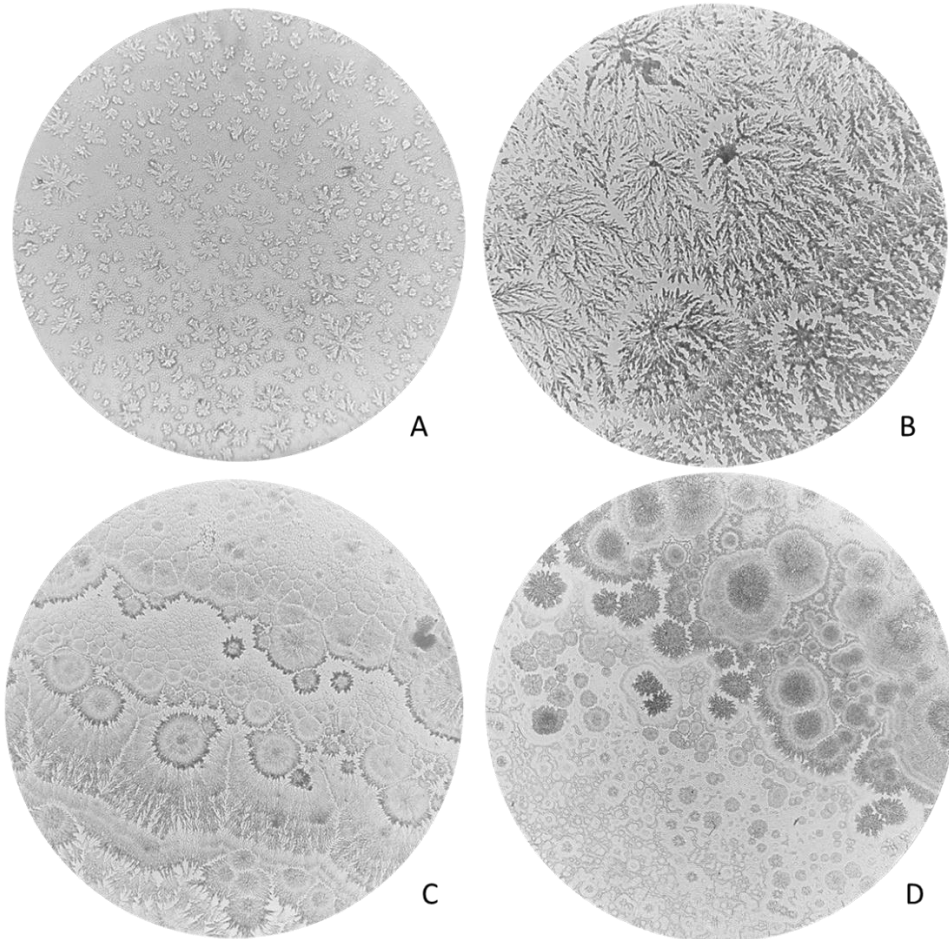
Os escores de cristalização salivar foram submetidos à análise de Variância para Medidas Repetidas via Modelos Lineares Generalizados (GZLM/GEE) do Programa SPSS, versão 18 e apresentados em média e erro padrão da média. As médias foram comparadas levando em consideração os dias ao longo de cada período experimental e comparando o dia em cada período experimental (outono x primavera) através do teste de Bonferroni considerando nível de significância de $P < 0,05$.

3.5 Resultados e discussão

O aumento da intensidade de cristalização salivar, em escores, foi um bom indicador para a determinação de estro em ovinos. Os padrões de cristalização salivar acompanharam as fases do ciclo estral definidas pelo protocolo de indução e sincronização de estro. A cristalização foi crescente, alcançou dois picos (dia 4 e dia 12) no outono e foi máxima no dia 12 na primavera decrescendo no dia 13. A cristalização salivar das ovelhas utilizadas neste estudo mostrou formas diferentes da usualmente descritas na literatura. Observamos desenhos semelhantes a “flocos de neve” (Figura 2A), caracterizados por pequenas folhas sem

ramificações e caules, observados mais no metaestro. Cristais em formato de folhas maiores, mais robustas e arredondadas (Figura 2B) foram observados nas lâminas no proestro e no estro. Formatos diferenciados, arredondados e bem delimitados similares à planta da região amazônica “vitória-regia” (Figura 2C) foram encontrados em algumas lâminas no período do estro (dia 12). Algumas cristalizações eram arredondadas, mas irregulares e sem delimitação definida, parecendo estar dispostas umas sobre as outras, semelhantes às “colônias fúngicas” (Figura 2D) e estavam presentes nas proximidades do estro. Folhas bastante alongadas similares a ramos, com caules longos e bem delimitadas foram observadas somente nos períodos de estro. Em alguns casos foram observados vários padrões de desenhos diferentes na mesma lâmina. Outro aspecto interessante foi que a maioria das lâminas apresentava mais de um tipo de cristalização e algumas ovelhas apresentaram padrões próprios de cristalização, pois todas as lâminas de determinado animal continham os mesmos desenhos, mudando somente a quantidade e sua distribuição na lâmina.

Figura 2 Diferentes padrões de cristalização salivar em ovelhas submetidas a protocolo de indução e sincronização de estro. Observadas em microscopia de luz em 200x. Flocos de neve (A), Cristais em formato de folhas maiores, mais robustas e arredondadas (B), planta vitória-regia (C), colônias fúngicas (D).



Fonte: próprio autor

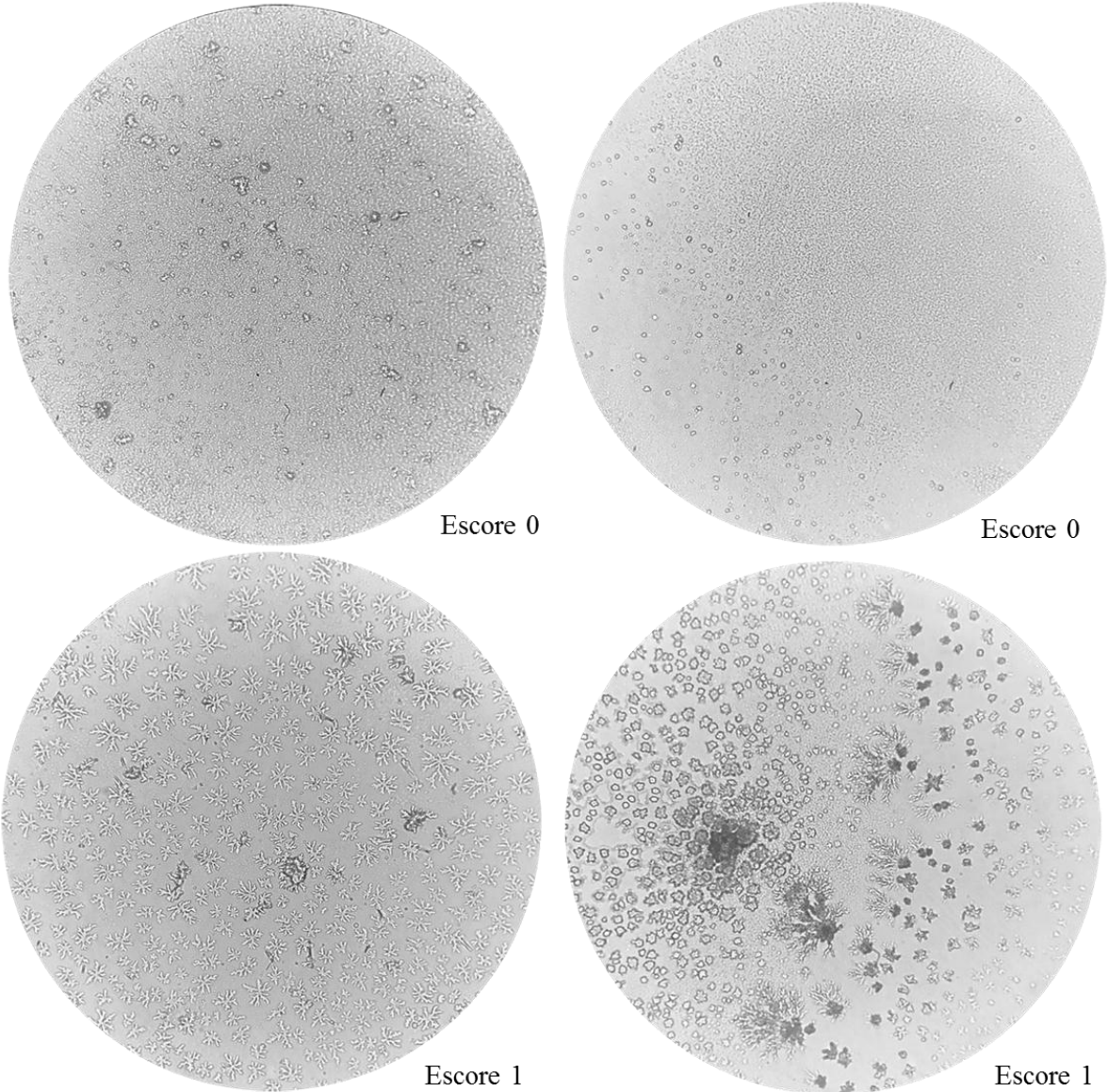
Nos estudos recentes que avaliaram a cristalização salivar durante as diferentes fases do ciclo estral, foram usadas diversas classificações dos padrões de cristalização utilizando como base o perfil de arborização. Em orangotangos foram utilizadas duas classificações (KUBÁTOVÁ; FEDOROVA, 2016). Na primeira, os autores utilizaram a classificação de humanos onde, nos dias não férteis não havia cristalização ou pequenos cristais aleatórios na lâmina; no período de transição as formas de cristalização eram de cristais intermediários combinados com pontos e outras formas de cristalização como tipo ramo (branch-like), tipo abeto (fir-like) e tipo samambaia (fern-like) e no período fértil o padrão típico de samambaia completamente formado era encontrado. Na segunda classificação, mais utilizada em animais, o método usado pelos autores foi o mesmo descrito em bovinos (SKALOVA; FEDOROVA; BRANDLOVA, 2013) que utilizaram a seguinte escala: sem cristalização (none), tipo ramo

(branch-like), tipo abeto (fir-like), tipo samambaia (fern-like), e suas combinações (branch-like e fir-like, branch-like e fern-like e branch-like, fir-like e fern-like).

Em búfalas, seis distintos padrões de cristalização foram utilizados. O padrão simétrico típico tipo-samambaia (typical symmetrical fern-like), tipo-ramo (branch-like), tipo abeto (fir-like), combinações de abeto-samambaia-ramo (combinatios of fir-fern-branch), pontilhado (dotted), e nenhum (none) (RAVINDER, *et al.*, 2016). Em estudo realizado em ovelhas durante o ciclo estral estacional foi observado no proestro samambaias com hastes curtas, no estro foram encontrados padrões claros de cristalização com hastes longas e claras, no metaestro as amostras mostraram padrões irregulares espalhados com pequenas samambaias e no diestro não houve evidencia nenhuma de cristalização. Os autores observaram que não ocorreu padrão uniforme de samambaia e que existiam diferentes características nas samambaias, devido ao estágio do ciclo estral (SANGEETHA; RAMESHKUMAR, 2015). Nas ovelhas utilizadas no nosso experimento não foi observado o padrão típico de samambaia na cristalização salivar, conforme descrito em trabalhos anteriores. Esse resultado pode ser decorrente do tratamento hormonal utilizado, que pode ter alterado as características típicas da cristalização salivar que ocorreria no estro natural.

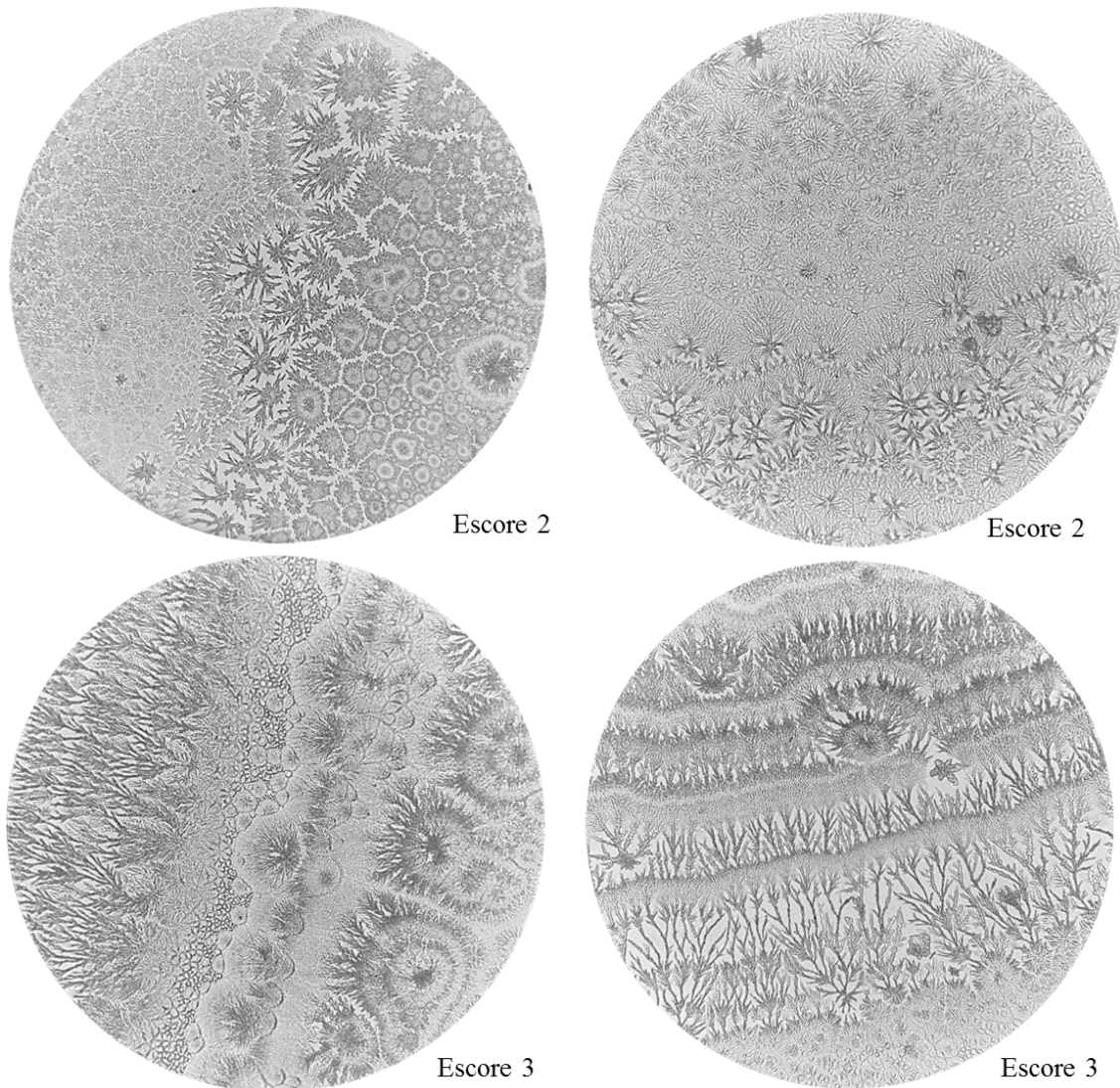
Como os padrões de cristalização observados no presente estudo não seguiram os padrões de arborização descritos na literatura decidimos utilizar uma classificação em escores de 0 a 3 baseadas na quantidade de cristalização observada na lâmina, levando em consideração o preenchimento do campo de observação (x200) e também o tipo de arborização observado. Sendo, “Escore 0 - sem cristalização” (Figura 3) caracterizado por pouquíssimos cristais disformes muito pequenos, praticamente pontos (dots) de cristalização com pouco preenchimento na lâmina. “Escore 1 - muito pouca cristalização” (Figura 3) caracterizado pela observação desde pequenos cristais com formatos de flocos de neve até folhas um pouco maiores e com pouco preenchimento da lâmina. “Escore 2 - pouca cristalização” (Figura 4) aparecem folhas maiores, mais robustas e arredondadas, podendo ter a presença de formas parecidas com “vitória regia” e “colônias fúngicas” e com poucos espaços não cristalizados na lâmina. “Escore 3 - muita cristalização” (Figura 4) foram observadas todas as outras formas anteriores como os “flocos de neve”, as folhas mais robustas e arredondadas, as formas de “vitória regia”, as formas de “colônia fúngica” e também folhas alongadas, com praticamente toda a lâmina preenchida com cristalização.

Figura 3 Diferentes padrões de cristalização salivar em ovelhas submetidas a protocolo de indução e sincronização de estro. Classificação do Escore 0 - sem cristalização e “Escore 1 - muito pouca cristalização”. Observadas em microscopia de luz em 200x



Fonte: próprio autor.

Figura 4 Diferentes padrões de cristalização salivar em ovelhas submetidas a protocolo de indução e sincronização de estro. Classificação do “Escore 2 - pouca cristalização” e “Escore 3 - muita cristalização”. Observadas em microscopia de luz em 200x.



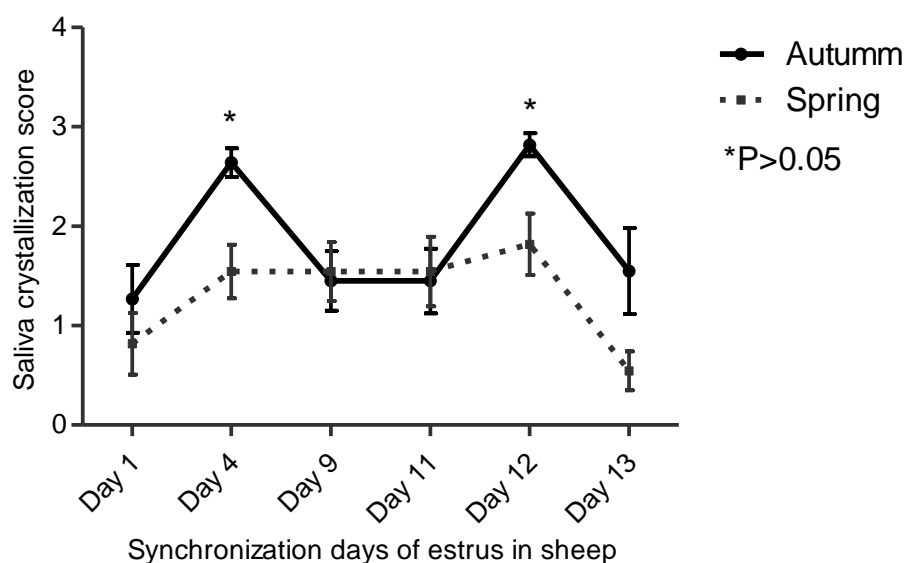
Fonte: próprio autor.

No outono (Gráfico 1 e Tabela 1) o menor escore foi observado no dia 1 do protocolo e permaneceu estável nos dias 9 e 11 (diestro) quando o predomínio hormonal foi da progesterona provinda do implante. A cristalização teve um pico no dia 4 (dia colocação do implante) que pode ser devido ao fato das ovelhas estarem na estação reprodutiva e, portanto poderiam estar próximas do estro estacional antes da colocação do implante. O segundo pico se deu com um aumento significativo da cristalização no dia 12 (24 horas após a retirada do implante e aplicação dos hormônios), data do possível estro e maior concentração de estrógeno, conforme o protocolo utilizado e quando observamos o maior escore de

cristalização da saliva nesse período experimental. Após o estro, houve diminuição significativa do escore de cristalização no dia 13.

Na Primavera (Gráfico 1 e Tabela 1) o escore de cristalização salivar aumentou gradativamente chegando ao seu valor máximo no dia 12, contudo sem diferença significativa entre os dias. Houve uma diminuição significativa da cristalização no dia 13 em relação ao dia 12, dia do estro. Quando comparamos os dias de coleta entre os períodos experimentais Outono e Primavera, observamos diferença significativa no Dia 4 (dia da colocação do implante), provavelmente porque no outono as ovelhas estavam ciclando, como mencionado anteriormente. No dia 12, o escore de cristalização da saliva das ovelhas na estação reprodutiva foi significativamente maior comparado com os escores da primavera. A menor cristalização salivar observada ao longo da primavera e a maior cristalização observada no dia do estro no outono poderiam ser decorrentes das condições ambientais, especialmente pela ação do fotoperíodo decrescente do outono, período fisiológico de melhor desempenho reprodutivo. Vale salientar que mesmo com a utilização de hormônios estimulatórios, o crescimento folicular é mais expressivo dentro da estação reprodutiva do que durante o período de anestro (BARRETT *et al.*, 2008).

Gráfico 1 Comparação do escore de cristalização salivar de ovelhas na estação reprodutiva (outono) e fora da estação reprodutiva (primavera) durante os dias da sincronização hormonal do estro. *Dia é significativamente diferente ($p < 0.05$) entre as estações. - Bonferroni test.



Fonte: próprio autor.

Tabela 1 Média, desvio padrão e intervalo de confiança dos escores de cristalização salivar de ovelhas obtidas durante os dias do protocolo de indução e sincronização do estro nos períodos experimentais primavera e outono.

Days	Autumm				Spring			
	Mean	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Mean	Std. Error	95% Wald Confidence Interval	
			Lower	Upper			Lower	Upper
Day 01	1,27 ^a	0,34	0,60	1,94	0,82 ^{ab}	0,31	0,21	1,43
Day 04	2,64 ^{bc}	0,15	2,35	2,92	1,55 ^{ab}	0,27	1,02	2,07
Day 09	1,45 ^a	0,30	0,87	2,04	1,55 ^{ab}	0,30	0,96	2,13
Day 11	1,45 ^a	0,32	0,82	2,09	1,55 ^{ab}	0,35	0,86	2,23
Day 12	2,82 ^b	0,12	2,59	3,05	1,82 ^a	0,31	1,21	2,43
Day 13	1,55 ^{ac}	0,43	0,70	2,39	0,55 ^b	0,20	0,16	0,93

Letras diferentes na coluna – diferença significativa ($P < 0.05$) – teste de Bonferroni.

Fonte: próprio autor.

3.6 Conclusões

Os padrões de cristalização salivar foram bons indicadores para determinação de estro em ovinos submetidos a protocolo de indução e sincronização de estro. A determinação do estro através da cristalização salivar é um método não invasivo de baixo custo e fácil realização que pode ser utilizado como ferramenta auxiliar. Estudos futuros avaliando a utilização da cristalização salivar no estro natural e em larga escala são oportunos.

4 ARTIGO CIENTÍFICO 2: PERFIL CITOLÓGICO VAGINAL DE OVELHAS SOBMETIDAS A PROTOCOLOS CURTOS DE INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO.

4.1 Resumo

As ovelhas apresentam ciclo reprodutivo estacional de dias curtos e associado a isso possuem sinais muito discretos de cio, sendo estes os maiores entraves na cadeia de produção da ovinocultura. A citologia vaginal é um método bastante utilizado para a diferenciação das células do epitélio vaginal na detecção de algumas patologias, das fases do estro e já foi descrito para a detecção de prenhes em algumas espécies. No presente estudo utilizou-se protocolo curto de indução e sincronização de estro e a partir do ciclo apresentado pelos animais foi feita a análise do perfil citológico vaginal. Foram utilizadas 11 ovelhas mestiças da raça Corriedale. Para a avaliação do perfil citológico vaginal as ovelhas foram submetidas a protocolo curto realizados em dois períodos experimentais: primavera e outono, realizado em seis momentos. A coleta das células do epitélio vaginal foi feita com as ovelhas devidamente contidas, realizando o afastamento dos lábios vulvares e a introdução de *swab* esterilizado na comissura dorsal da vulva até o canal vaginal. O swab foi friccionado na parede vaginal em todas as direções, permitindo a colheita das células. O swab foi utilizado para confecção de esfregaços, em lâminas de vidro secos à temperatura ambiente e fixados em álcool a 95%. Em seguida, foram corados pelo método panótico rápido. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico de luz (Microscópio Olympus CX 40) com aumentos de 200x para a contagem de 100 células por lâmina. As células do epitélio vaginal foram classificadas em basal, parabasal, intermediária, superficial nucleada e superficial anucleada e neutrófilos. O estudo da citologia vaginal de ovelhas submetidas a protocolo curto mostrou que existe diferenciação, dos tipos celulares conforme as fases do ciclo estral. Apesar da predominância de um tipo celular por todo o ciclo e de não existir predominância de um tipo celular em cada fase, a técnica pode auxiliar no controle reprodutivo de ovelhas submetidas a protocolos de indução e sincronização de estro.

Palavras-chave: Ovinocultura, manejo reprodutivo, estro, citologia.

4.2 Abstract

The ewes present a short reproductive seasonal cycle and associated with this have very discrete estrus signals, which are the main obstacles in the sheep production chain. Vaginal cytology is a widely used method to differentiate the vaginal epithelial cells in the detection of some pathology, the stages of estrus and has already been described for the detection of pregnancies in some species. In the present study, a short protocol of synchronization and induction of estrus was used and the analysis of the vaginal cytological profile was performed from the cycle presented by the animals. Eleven crossbred ewes of Corriedale breed were used. In order to evaluate the vaginal cytological profile, the sheep were submitted to a short protocol performed in two experimental periods: spring and autumn, performed in six moments. The collection of the cells from the vaginal epithelium was made with the ewes properly contained, opening the vulvar lips and introducing a sterile swab on the dorsal commissure of the vulva to the vaginal canal. The swab was rubbed into the vaginal wall in all directions, allowing the cells to be harvested. The swab was used to make smears, on glass slides dried at room temperature and fixed in 95% alcohol. They were then stained by the rapid panoptic method. The slides were observed under light microscopy (Olympus CX 40 microscope) with increases of 200x for the count of 100 cells per slide. The vaginal epithelium cells were classified into basal, parabasal, intermediate, superficial nucleated and superficial anucleate and neutrophils. The study of the vaginal cytology of sheep submitted to short protocol showed that there is differentiation of the cell types according to the phases of the estrous cycle. Despite there is a predominance of one cell type throughout the cycle, there is no predominance of a cell type in each phase and the technique can help in the reproductive control of sheep submitted to induction and synchronization of estrus protocols.

Key words: Sheep farming, reproductive management, estrus, cytology.

4.3 Introdução

A ovinocultura vem ganhando espaço dia a dia, principalmente pela sua produção diversificada, que pode ser de carne, lã, leite, e ainda existe a possibilidade de produzir espécies com dupla aptidão na mesma propriedade. No entanto, a estacionalidade reprodutiva da espécie é um dos maiores entraves enfrentados na cadeia produtiva (MATOS *et al.*, 2015),

Afetando diretamente a produção de cordeiro e tornando-a restrita a um determinado período do ano. Os ovinos são poliéstricos estacionais de dias curtos, ou seja, o período cíclico ocorre no verão e no outono, e o anestro durante o restante do ano (RODRIGUES; SASA, 2010). Decorrente dessa situação associada a uma demanda crescente de mercado o uso de biotécnicas de reprodução e detecção de estro se fazem necessários, pois além de diminuir ao máximo o período não produtivo, podem proporcionar aumento do número de partos e conseqüentemente da produção de cordeiros que pode ocorrer durante o ano todo tornando atividade mais rentável.

O controle da reprodução pode ser feito por vários métodos já desenvolvidos a administração de hormônios exógenos que modificam a fisiologia do ciclo estral natural das ovelhas e outros, sem a administração de hormônios, como o controle das horas de luz e o efeito macho, (ABECIA; FORCADA; GONZÁLES-BULNES, 2012).

Os discretos sinais de estro apresentados pelas ovelhas é outro fator prejudicial à eficiência reprodutiva da espécie (CASTILHO *et al.*, 2007). A citologia vaginal esfoliativa pode ser utilizada em várias espécies, pois é um indicador sensível das mudanças que ocorrem ao longo do ciclo estral. Tais mudanças, em algumas situações, servem de diagnóstico auxiliar confiável para determinar qual o período reprodutivo e o momento ótimo para a realização da cobertura ou da inseminação artificial (REZENDE, 2006).

Já foram feitas pesquisas em ursos pandas, leões africanos, caititus, tamanduás e cachorro-do-mato, com a finalidade de observar o aparecimento de um mesmo padrão citológico verificado em cães e gatos e para poder realizar a reprodução assistida *ex situ* no momento certo destas espécies (SNOECK; CRUZ; CATENACCI, 2010).

Contudo, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil citológico vaginal de ovelhas submetidas a protocolos curtos de indução e sincronização de estro.

4.4 Materiais e métodos

Os procedimentos envolvendo os animais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no projeto 32772.

4.4.1 Animais e protocolo de indução e sincronização do ciclo estral

Foram utilizadas 11 ovelhas mestiças da raça Corriedale mantidas em piquete de campo nativo melhorado com pastagem cultivada de milho (*Pennisetum americanum*) e capim aruana (*Panicum Maximum*) com água à vontade na unidade de criação de ovinos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizada na cidade de Porto Alegre, RS, Sul do Brasil (30°01'40"S, 51°13'43"W).

Para a avaliação do perfil da citologia vaginal as ovelhas foram submetidas a protocolo curto de indução e sincronização realizados em dois períodos experimentais: Primavera - 01 de novembro a 13 de novembro de 2016 (fora da estação reprodutiva) e outono - 31 de março a 12 de abril de 2017 (estação reprodutiva). Em fase aleatória do ciclo estral (dia 0), cada ovelha recebeu um dispositivo intravaginal (Primer®, Tecnopec, Brasil) impregnado com 0,36g de progesterona por sete dias. A colocação do dispositivo foi realizada conforme instruções do fabricante com o auxílio de um aplicador específico. No dia da retirada do dispositivo, dia 7, as ovelhas receberam 0,0375 mg de D-Cloprostenol (Prolise®, Tecnopec, Brasil) e 10mg de Foltropina de pituitária suína (NIH-FSH-P1 of Folltropin-V - Folltropin®, Tecnopec, Brasil) por via intramuscular.

4.4.2 Esfregaços vaginais e avaliação da citologia vaginal

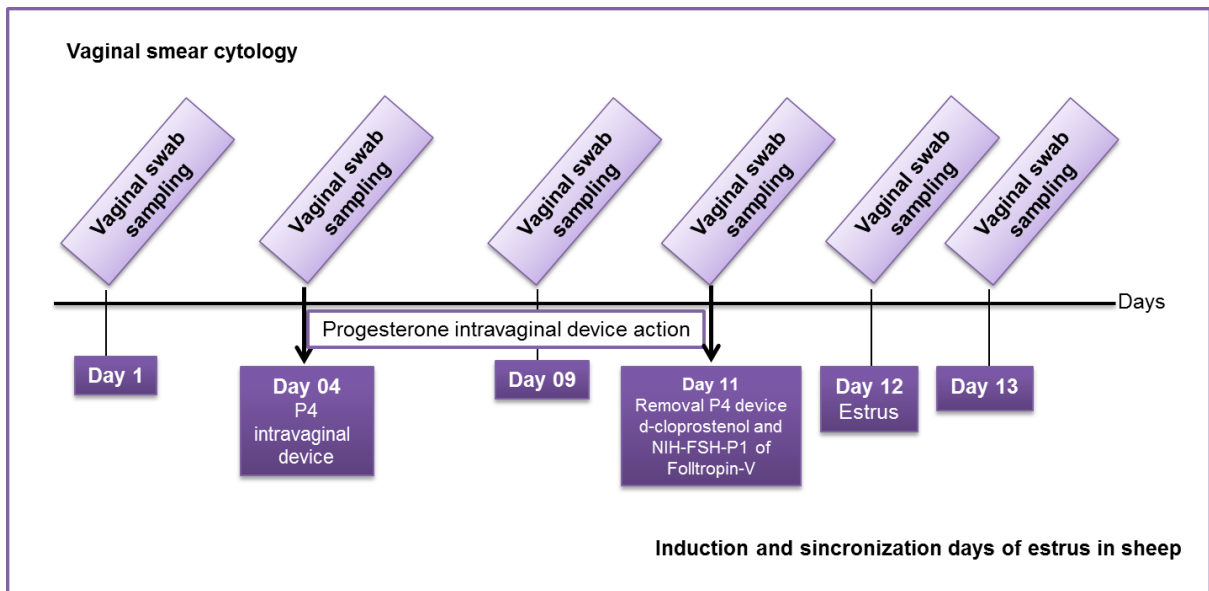
O perfil da citologia vaginal foi realizado em seis momentos durante os períodos experimentais: Dia 1: -3 dias da colocação do implante; Dia 4: dia da colocação do implante; Dia 9: 5 dias após a colocação do implante; Dia 11: dia da retirada do implante e aplicação dos hormônios; Dia 12: 24 horas após a retirada do implante (provável estro) e Dia 13: 48 horas após a retirada do implante (Figura 1).

Para a coleta das células do epitélio vaginal as ovelhas foram devidamente contidas, foi realizado o afastamento dos lábios vulvares e a introdução de *swab* esterilizado na comissura dorsal da vulva até o canal vaginal. Em seguida o *swab* foi friccionado na parede vaginal em todas as direções, permitindo a colheita das células epiteliais vaginais.

O *swab* com as células epiteliais vaginais foi utilizado para confecção de esfregaços, em lâminas de vidro devidamente identificados, secos à temperatura ambiente e fixados em álcool a 95%. Em seguida, foram corados pelo método panótico rápido, que consiste na passagem de cada lâmina na solução: I (solução de Ciclohexadrenos 0,1% por cinco segundos, cinco imersões por um segundo cada), II (solução de Azobenzenosulfônicos a 0,1% por cinco segundos), III (solução de Fenotiazinas a 0,1% por cinco segundos), lavados em água corrente. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico de luz (Microscópio Olympus

CX 40) com aumentos de 400x para a contagem de 100 células por lâmina e avaliação das características morfológicas e tintoriais das células epiteliais nos momentos avaliados. As células do epitélio vaginal foram classificadas em basal, parabasal, intermediária, superficial nucleada e superficial anucleada. Os neutrófilos presentes nas lâminas foram avaliados de maneira semi-qualitativa e classificado em escores, sendo Escore 0 – ausência de neutrófilos, Escore 1 – poucos neutrófilos e Escore 3 – muitos neutrófilos.

Figura 1. Linha do tempo das coletas dos esfregaços vaginais e avaliação da citologia vaginal durante os dias de protocolo de indução e sincronização de estro nos dois períodos experimentais, primavera e outono, para avaliação do padrão de cristalização salivar em ovelhas.



Fonte: próprio autor.

4.4.3 Análise estatística

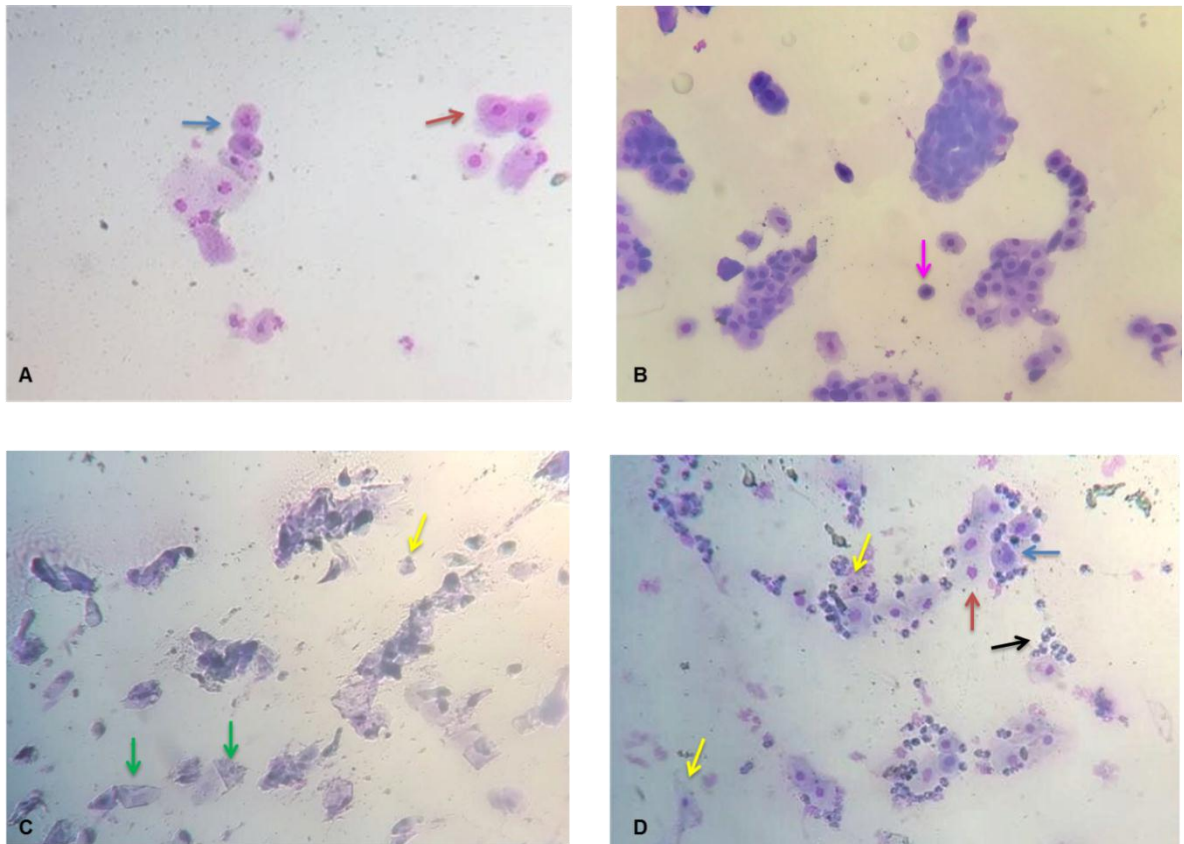
As porcentagens dos tipos celulares e os escores da presença de neutrófilos obtidos na citologia vaginal foram submetidos à análise de Variância para Medidas Repetidas via Modelos Lineares Generalizados (GZLM/GEE) do Programa SPSS, versão 18 e apresentados em média e erro padrão da média. As médias foram comparadas levando em consideração os dias ao longo de cada período experimental e comparando o dia em cada período experimental (outono x primavera) através do teste de Bonferroni considerando nível de significância de $P < 0,05$.

4.5 Resultados e discussão

Os tipos celulares presentes no epitélio vaginal identificados foram: basal, parabasal, intermediário, superficial nucleado, superficial anucleado e neutrófilos (Figura 2). As células basais são pequenas, com pouco citoplasma e foram encontradas em menor número na maioria dos esfregaços vaginais. As células parabasais possuem núcleo grande e pouco citoplasma, com formato esférico ou oval. As células intermediárias são maiores que as parabasais, com formato esférico, oval ou poliédrico, sendo a relação, núcleo e citoplasma menor. As células superficiais são grandes e chatas, possuem formato irregular ou poliédrico com citoplasma transparente e núcleo denso picnótico localizado centralmente, podendo ser anucleadas. As células intermediárias foram predominantes, em ambos os períodos experimentais. Em ovelhas indígenas esse tipo celular dominou a maioria dos esfregaços celulares (ZOHARA *et al.*, 2014) havendo predomínio também em estudo com ovelhas da raça Santa Inês (PORTO *et al.*, 2007).

O epitélio vaginal é constituído por diferentes camadas morfológicamente e a sua alteração se dá devido ao estímulo hormonal predominante de cada período do ciclo, os quais são identificados com o auxílio de colorações histológicas apropriadas (RIBEIRO *et al.*, 2012). Algumas mudanças fisiológicas reprodutivas como a gestação e ou o período pós-parto apresentam diferentes concentrações hormonais de progesterona e estrógeno, que também podem ser verificadas através da citologia vaginal. Nos mamíferos, a descamação do epitélio e a cornificação das células é causada pela atividade estrogênica (SHARMA; SHARMA, 2016).

Figura 1 - Perfil citológico vaginal de ovelhas submetidas à indução e sincronização de estro. Células coradas pelo método panótico, observadas em microscopia de luz em 200 x.



Legenda: A) seta azul célula parabasal; seta vermelha célula intermediária; B) seta rosa célula basal C) setas verdes células superficiais anucleadas; D) setas amarelas células superficiais nucleadas; seta azul célula parabasal; seta vermelha célula intermediária; seta preta neutrófilos.

Fonte: próprio autor.

No primeiro período experimental realizado na primavera (Gráfico 1), momento em que ocorre o anestro da espécie ovina, verificamos o predomínio das células intermediárias seguidas pelas células parabasais nos dias 1 (antes da colocação do implante) e 4 (momento da colocação do implante de progesterona). Em preguiça de coleira as células parabasais são normalmente encontradas na fase de anestro, no início do proestro e no diestro (SNOECK; CRUZ; CATENACCI, 2011).

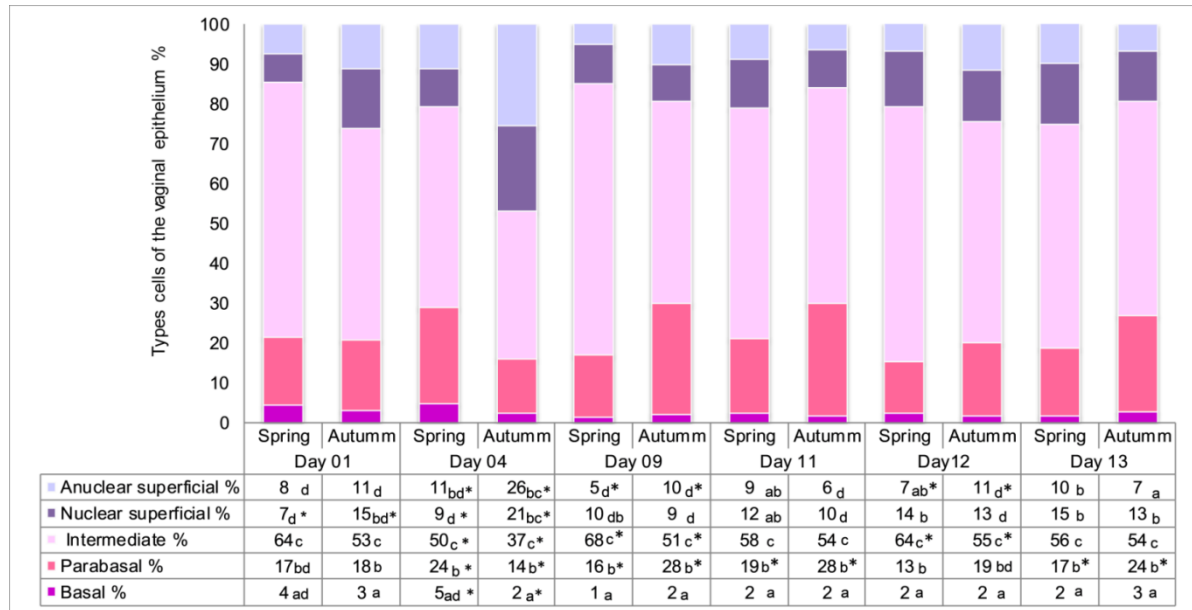
No segundo período experimental, feito no outono, (Gráfico 1) no qual acontece à estação reprodutiva, no dia 4 (colocação do implante) as células superficiais nucleadas e anucleadas foram predominantes, seguidas das células intermediárias, provavelmente devido aos hormônios endógenos referentes à estação reprodutiva. Tal fato se deu de forma semelhante em estudo com cabras induzidas e cíclicas, que apresentaram variação no padrão citológico celular do grupo induzido com hormônios em relação ao grupo controle que apresentou estro natural, nas fases de proestro, estro e diestro (TONIOLLO *et al.*, 2005).

Nos dias 9 e 11, sob ação da progesterona advinda do implante, foi observado perfil citológico vaginal característico do diestro, com predomínio das células intermediárias seguidas das parabasais e um aumento não significativo do número de neutrófilos no outono. Padrão similar descrito em revisão na espécie bovina (SHARMA; SHARMA, 2016). Comparando-se os períodos experimentais, o dia 9, no outono, houve maior quantidade de células superficiais anucleadas e parabasais em relação à primavera quando as células intermediárias estavam em maior quantidade.

O dia 12 (estro), na primavera as células predominantes foram as intermediárias seguidas das parabasais. No outono, com relação à predominância de células não houve diferença, porém apresentou maior quantidade de células superficiais anucleadas do que na primavera. Resultado que difere do encontrado em ratas, com a presença da predominância de células superficiais anucleadas (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015). Em ovelhas indígenas, a fase de estro apresentou maior concentração de células superficiais e superficiais anucleadas, atingindo o seu valor máximo (ZOHARA *et al.*, 2014). Mesmo resultado encontrado em cabras cíclicas, no qual as células superficiais anucleadas foram significativamente superiores durante o estro (RAPOSO *et al.*, 2000).

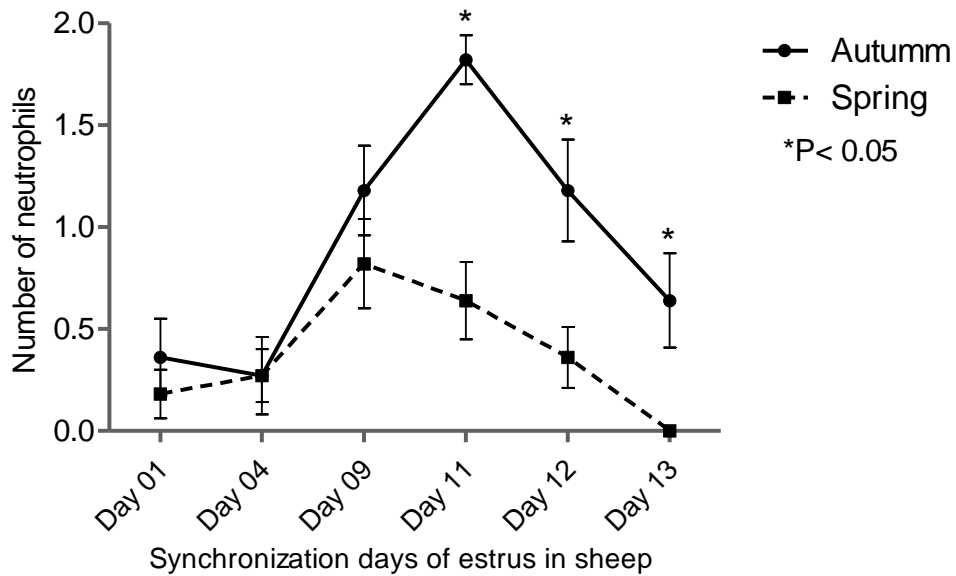
Os neutrófilos estiveram presentes durante todas as fases do ciclo (Gráfico 2 e Tabela 1), tal fato pode ser explicado pela utilização do implante de progesterona para a indução e sincronização de estro. A presença de resposta inflamatória com mudanças histológicas e citológicas no epitélio vaginal em ovelhas submetidas a protocolos com esponja intravaginal foi constatado (MANES *et al.*, 2015), confirmando a hipótese de que o uso de dispositivos intravaginais produz não só mudança na flora vaginal, mas também causa processos inflamatórios subagudos no epitélio vaginal.

Gráfico 1 Perfil citológico vaginal de ovelhas submetidas à indução e sincronização de estro



Letras diferentes na mesma coluna - diferença estatística significante P<0,05 Teste de Bonferroni
 *No tipo celular no dia – diferença estatística significante entre os períodos, primavera e outono, P<0,05 Teste de Bonferroni.
 Fonte: próprio autor.

Gráfico 2 Comparação do escore de neutrófilos na citologia vaginal de ovelhas na estação reprodutiva (outono) e fora da estação reprodutiva (primavera) durante os dias da sincronização hormonal do estro. *Dia é significativamente diferente (p<0.05) entre as estações. - Bonferroni test.



Fonte: próprio autor.

Tabela 1 Média, desvio padrão da media e intervalo de confiança dos escores de neutrófilos na citologia vaginal de ovelhas durante os dias de sincronização do estro.

Days	Autumm				Spring			
	Mean	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Mean	Std. Error	95% Wald Confidence Interval	
			Lower	Upper			Lower	Upper
Day 01	0.36 ^{abd}	0.19	-0.02	0.74	0.18 ^a	0.12	-0.05	0.41
Day 04	0.27 ^{ad}	0.19	-0.09	0.64	0.27 ^a	0.13	0.01	0.54
Day 09	1.18 ^{bcd}	0.22	0.76	1.60	0.82 ^a	0.22	0.40	1.24
Day 11	1.82 ^c	0.12	1.59	2.05	0.64 ^a	0.19	0.26	1.02
Day 12	1.18 ^{dc}	0.25	0.69	1.67	0.36 ^{ab}	0.15	0.08	0.65
Day 13	0.64 ^d	0.23	0.18	1.09	0.00 ^b	0.00	0.00	0.00

Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0.05$) - Bonferroni teste

Fonte: próprio autor.

4.6 Conclusões

O estudo da citologia vaginal de ovelhas submetidas a protocolos mostrou que existe diferenciação, dos tipos celulares conforme as fases do ciclo estral. Apesar da predominância de um tipo celular por todo o ciclo e de não existir predominância de somente um tipo celular em cada fase, a técnica pode auxiliar no controle reprodutivo de ovelhas submetidas a protocolos de indução e sincronização de estro.

REFERÊNCIAS

- ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLES-BULNES A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Anim Reprod Sci**, v.130, p.173-179, 2012.
- ÁVILA, V. S., *et al.* O retorno da ovinocultura ao cenário produtivo do Rio Grande do Sul. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 11, n. 11, p. 2419–2426, 2013.
- BANDEIRA, D. A., *et al.* Aspectos gerais da caprino-ovinocultura no Brasil e seus reflexos produtivo e reprodutivo. *In: Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha*. Editora Varela, São Paulo, 2004, p.1-8.
- BARRETT, D. M. W. *et al.* Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 827-836, 2008.
- BOLAND, M. P.; CROSBY, F.; O CALLACHAN, D. Artificial control of the breeding season in ewes. **Irish Veterinary Journal**, v.43, p2-6, 1990.
- CASTILHO, C. *et al.* Indução do estro em ovelhas da raça Texel durante o anestro estacional utilizando meio implante de progestágeno novo ou reutilizado. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 13, n. 1, p. 39-45, 2007.
- CORA, M. C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. **Toxicologic pathology**, v. 43, n. 6, p. 776-793, 2015.
- FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G.; BRUSCHI, J. H. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. *In: SIMPÓSIO DE CAPRINOS E OVINOS DA EV-UFGM*, 2., 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: EV-UFGM, 2007. p. 167.
- GNANAMUTHU, G.; RAMESHKUMAR, K. Determination of estrus in umblachery cattle (*Bos indicus*) by salivary fern pattern. **History**, v. 13, n. 41, p. 68-78, 2015.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO J.R.; FREITAS V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda, 2002. 2 ed., p.35-41.
- HABEROVÁ, T. A preliminary study of saliva crystallization in Bactrian camels (*Camelus bactrianus*). *In: SCIENTIFIC CONFERENCE OF INSTITUTE OF TROPICS AND SUBTROPICS ON SUSTAINABLE USE OF NATURAL RESOURCES IN TROPICS AND SUBTROPICS (CULS)*, 4TH., 2010, Prague. p. 28.
- HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. Editora Manole, São Paulo, 6 ed., 1995.
- HAFEZ B.; HAFEZ E. S. E. **Reprodução animal**. Editora Manole, São Paulo, 7 ed. p 173-178, 2004.

- IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal**. 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2016.
- JUNIOR, C. J.; RODRIGUES, L. S.; MORAES, V. E. G. **Ovinocaprinocultura de corte – a convivência dos extremos**. 2010. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3108.pdf. Acesso em: 20 jun. 2016.
- KNIGHTS, M. *et al.* Effectiveness of intravaginal progesterone inserts and FSH for inducing synchronized estrus and increasing lambing rate in anestrus ewe. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 1120-1131, 2001.
- KUBÁTOVÁ, A.; FEDOROVA, T. Saliva Crystallization Occurs in Female Bornean Orangutans (*Pongo pygmaeus*): Could It Be a New Option for Monitoring of Menstrual Cycle in Captive Great Apes? **PLoS one**, v. 11, n. 7, p. e0159960, 2016.
- LORENZEN, E. *et al.* Characterization of cytological changes, IgA, IgG and IL-8 levels and pH value in the vagina of prepubertal and sexually mature Ellegaard Göttingen minipigs during an estrous cycle. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 59, p. 57-62, 2016.
- MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. Avaliação de programas hormonais para a indução e sincronização do estro em caprinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Sobral, v.36, n.1, p.171-178, 2001.
- MANES, J. *et al.* Vaginal histological changes after using intravaginal sponges for oestrous synchronization in anoestrous ewes. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, n. 2, p. 270-274, 2015.
- MATOS, J. A. *et al.* Pessários vaginais para indução de cios em fêmeas ideal durante a reprodução dados preliminares. *In: Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal do Pampa, 7., Uruguaiana. Anais...* Uruguaiana: Universidade Federal do Pampa, 2015.
- MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with time artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, fertility and development**, v. 16, n. 1, p. 403-413, 2004.
- MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. Porto Alegre: Editora Sulina, 6 ed., 1987.
- MORAES J. C. F.; SOUZA C. J. H.; GONÇALVES P. B. D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. *In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, Varela, p.25-55, 2002.
- MORELLO, H. H.; CHEMINEAU, P. Características anatômicas e funcionais do sistema reprodutor da fêmea. *In: Reprodução ovina e caprina*. São Paulo, MedVet, p-11-25, 2008.
- PARDO-CARMONA, B. *et al.* Saliva crystallization as a means of determining optimal mating time in bitches. **Journal of Small Animal Practice**, v. 51, n. 8, p. 437-442, 2010.

PORTO, R. R. M. *et al.* Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça Santa Inês no acompanhamento do ciclo estral. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 521-527, 2007.

RAPOSO, R. S. *et al.* Perfil citológico vaginal de cabras da raça Saanen. **Revista Ciência Animal**, Fortaleza, v. 9, n.2, p.75-79, 1999.

RAPOSO, D. S. R. *et al.* Comparação da citologia vaginal de Cabras Cíclicas e Gestantes da Raça Saanen. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 2, n. 1, 2000.

RAVINDER, R. *et al.* Saliva ferning, an unorthodox estrus detection method in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1147–1155, 2016.

REZENDE, L. C. **Perfil citológico vaginal e dinâmica folicular durante o ciclo estral em novilha nelore**. 2006. 47f. Tese (Mestrado em Ciências)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

RIBEIRO, V. M. F. *et al.* Quadro citológico vaginal, concentração plasmática de progesterona durante a gestação e medidas fetais em pacas (*Cuniculus paca Linnaeus, 1766*). **Acta Amazônica**, v.42, p. 445-454, 2012.

RODRIGUES, R. A.; SASA, A. Desempenho reprodutivo de ovelhas induzidas ao estro durante o período de anestro sazonal na região do cerrado – Pantanal. *In: Anais do ENIC*, n.2 (2010).

SANGEETHA, P.; RAMESHKUMAR, K., Detection of estrus in sheep (*Ovis aries*) by salivary fern pattern and vaginal cytological examination with relation to estrogen. **The Scitech Journal**, v.02, p. 29-33, 2015.

SANTOS, T. C. *et al.* Diagnóstico reprodutivo e sanitário da ovinocultura familiar na localidade Garupá/Uruguaiana-RS: dados preliminares. *In: ANAIS DO VII SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA*, v. 7, n. 3, 2015.

SHARMA, M.; SHARMA, N. Vaginal cytology: an historical perspective on its diagnostic use. **Adv. Anim. Vet Sci**, v.4, n.6, p. 283-288, 2016.

SKALOVA, I.; FEDOROVA, T.; BRANDLOVA, K. Short Communication Saliva Crystallization in Cattle: New Possibility for Early Pregnancy Diagnosis? **Agricultura Tropica et Subtropica**, v. 46, n. 3, p. 102-104, 2013.

SNOECK, P. P.N.; DA CRUZ, A. C. B.; CATENACCI, L. S. Citologia vaginal de preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 271-275, 2011.

TONIOLLO, G. H. *et al.* Citologia vaginal em cabras alpinas sincronizadas com CIDR® e ECG. **Archivos de Zootecnia**, v. 54, n. 208, 2005.

TSILIGIANNI, T. H. *et al.* Chemical properties of bovine cervical mucus during normal estrus and estrus induced by progesterone and/or PGF2 α . **Theriogenology**, v. 56, n. 1, p. 41-50, 2001.

VINOLES, C. *et al.* Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 55, p. 993-1004, 2001.

ZOHARA, B. F. *et al.* Exfoliative vaginal cytology and serum progesterone during the estrous cycle of indigenous ewes in Bangladesh. **Journal of Embryo Transfer**, v. 29, n. 2, p. 183-188, 2014.

WEBER, P. C. Physical principles of protein crystallization. **Advances in protein chemistry**, v. 41, p. 1-36, 1991.