

UTILIZAÇÃO DA VITAMINA C PARA DESVIO DA PROPORÇÃO DO SEXO EM CADELAS IDENTIFICADAS EM ESTRO PELA COLPOCITOLOGIA

(Use of vitamin c to deviate the sex proportion in bitches identified in estrus by colpocytology)

Leda Maria Costa Pereira BERSANO^{1*}; Paulo Ricardo de Oliveira BERSANO²

¹Laboratório de Diagnóstico por Imagem aplicado à Reprodução da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza/CE. CEP: 60.740-000.

²Laboratório de Patologia e Medicina Veterinária Legal (UECE). *E-mail: leda.pereira@uece.br

RESUMO

Vários estudos têm sido desenvolvidos tentando esclarecer a determinação do sexo e os fatores responsáveis pelo desvio da proporção do sexo. O presente trabalho teve como objetivo administrar a vitamina C na tentativa de promover o desvio da proporção do sexo de cadelas detectadas em estro pela colpocitologia para o sexo feminino. Utilizaram-se 40 animais, com idade variando de dois a sete anos, provenientes de dois canis do município de Salvador- BA e região metropolitana. As cadelas foram acompanhadas quinzenalmente utilizando-se da colpocitologia para identificação da fase de estro. Após a detecção do início do proestro (sangramento vaginal), foi realizado o acompanhamento em dias alternados com o objetivo de avaliar o melhor dia para a cobertura do animal. Os animais foram acasalados durante um período 5 dias. Administrou-se 40mg/kg de vitamina C, por via oral, duas vezes ao dia, de forma suplementar. O tratamento iniciou-se 24 horas antes da cobertura, finalizando 24h após o último dia de cópula, ou seja, após os 8 dias. Houve o nascimento de 58% de fêmeas, entretanto esse desvio não foi estatisticamente significativo. Concluiu-se que mais estudos devem ser realizados para tentar determinar quais fatores são responsáveis pela taxa de natalidade macho: fêmea em cães.

Palavras-chave: Citologia vaginal, ácido ascórbico, seleção do sexo, cadelas.

ABSTRACT

Several studies have been developed trying to clarify the determination of sex and the factors responsible for the deviation of the sex proportion. This study aimed to administer vitamin C in an attempt to promote the deviation of the sex proportion of female dogs detected in estrus by colpocytology. Forty animals, aged between two and seven years, from two kennels in the city of Salvador-BA and metropolitan region were used. The bitches were followed every two weeks using colpocytology to identify the estrus phase. After detecting the onset of proestrus (vaginal bleeding), follow-up was carried out on alternate days in order to assess the best day for covering the animal. The animals were mated for a period of 8 days. The total 40mg/kg of vitamin C was administered orally twice a day. Treatment started 24 hours before mating, ending after the last day of copulation, that is, after 8 days. There was the birth of 58% of females, however this deviation was not statistically significant. We concluded that however further studies should be carried out to try to determine what factors are responsible for the male:female birth rate in dogs.

Keywords: Vaginal cytology, ascorbic acid, sex selection, bitches.

INTRODUÇÃO

Atualmente os animais de companhia, especialmente os cães e gatos, ocupam posição de destaque no ambiente familiar. Existe uma grande preferência por fêmeas, especialmente nas raças de pequeno e médio porte que são ditas como cães de companhia. São vários os fatores que favorecem essa preferência: a possibilidade de gerar novos produtos, a inconveniente marcação de território efetuada pelos machos e um maior valor de mercado (MURI, 2004). A

Recebido: set./2021.

Publicado: set./2023.

razão sexual ao nascimento de mamíferos é influenciada por diversos fatores e apesar de ser de grande interesse por parte dos criadores, este é um aspecto ainda pouco estudado nesta espécie.

Em mamíferos, a determinação sexual ao nascimento é muitas vezes imprevisível e inconsistente, levando alguns pesquisadores a questionar seu significado evolutivo. A proporção sexual teórica de 1: 1 no momento da concepção não corresponde àquela observada no nascimento em mamíferos, e há várias possibilidades para explicar esta diferença (BERRY *et al.*, 2011; CAMERON *et al.*, 2017). Em vertebrados, a determinação do sexo pode ser controlada por fatores genéticos (determinação genética do sexo), por fatores ambientais (determinação do sexo ambiental) ou uma combinação de ambos os tipos (HEULE *et al.*, 2014).

As fêmeas mamíferas podem participar do controle do sexo de sua progênie interferindo no transporte no aparelho genital, de um dos dois tipos de espermatozoides, selecionando essas células no local de fecundação (controle pré-fecundação) e selecionando embriões ou fetos. Apesar da fêmea ter o controle bioquímico do sistema genital, o controle do sexo acontece devido as diferenças entre os espermatozoides X e Y (HARDY, 1997).

Há muitas diferenças teóricas entre espermatozoides X e Y, como as diferenças físicas do tamanho, peso e densidade; velocidade; cargas elétricas de superfície; proteínas macromoleculares de superfície; efeitos diferenciais de pH (potencial hidrogeniônico) e diferentes efeitos da pressão atmosférica. Porém essas diferenças são tão pequenas que atualmente é difícil sua diferenciação, logo os espermatozoides são considerados idênticos em suas características (GARNER e SEIDEL, 2008).

Uma das hipóteses que explica a variação na proporção de sexos é a de que os espermatozoides dos diferentes sexos possuem motilidades diferentes, portanto, as condições do sistema genital da fêmea, como por exemplo, as características do muco cervical, o pH vaginal e o momento em que a cópula ocorre em relação ao estro, podem favorecer um ou outro tipo de espermatozoide (ROSENFELD e ROBERTS, 2004).

Em relação ao pH vaginal, experimentos em cadelas (MURI, 2004) e porcas (MORATO, 2008), com administração oral do ácido ascórbico (vitamina C), mostraram um desvio na proporção do sexo, ocasionando um maior nascimento de fêmeas. A vitamina C é uma das mais instáveis de todas as vitaminas e devido a sua composição, o ácido ascórbico tem grande potencial de acidificação, podendo reduzir o pH vaginal, e, conseqüentemente, alterar o transporte de espermatozoides Y ou X já que, sugere-se, que esses últimos são mais resistentes nesse meio (SHETTLES, 1970). Em humanos, o ácido ascórbico é utilizado como uma abordagem terapêutica acidificante proporcionando ação duradoura na flora vaginal. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação da vitamina C, sobre o desvio da proporção de sexo para fêmeas, em cadelas, detectadas em estro pela colpocitologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem do material em estudo

A pesquisa foi realizada em dois canis em Salvador/BA e região metropolitana. O experimento utilizou 38 cadelas primíparas, com idade variando de dois a sete anos, pesando entre 4 a 7kg. Um canil destinado à criação das raças Shitzu (20) e Yorkshire (3), com 25 animais e outro destinado à criação de Shitzu (10) e Lhasa Apso (5), com um total de 15

animais. Foram selecionadas para o experimento apenas as cadelas que estavam tendo a primeira cria. O projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará, sob o número de protocolo 025421/2020.

Acompanhamento do ciclo estral das cadelas

Para detecção da fase do ciclo estral, foi realizado acompanhamento quinzenal das cadelas utilizando-se da colpocitologia para identificação do estro. Após a detecção do início do proestro (presença de sangramento vaginal e observação das células detectadas pela colpocitologia) foi feito o acompanhamento em dias alternados com o objetivo de avaliar o melhor dia para a cobertura do animal. Os animais eram acasalados durante uma média de seis dias. Administrou-se, de forma suplementar, o equivalente a 40mg/kg de vitamina C (Vita-Vet C, Vetnil, Louveira, Brasil), a cada 12 horas, por via oral, com auxílio de uma seringa. O tratamento iniciou-se 24 horas antes da primeira cópula, finalizando 24 horas após a última cobertura, totalizando oito dias de tratamento. A alimentação dos animais selecionados era composta de ração seca comercial super premium para cães adultos, com a dosagem estipulada de acordo com o fabricante para cada porte de animal, oferecida duas vezes ao dia.

A mensuração do pH vaginal das cadelas foi realizada diariamente, durante todo o período de acasalamento, com auxílio de fitas (D52348, Macherey-Nagel[®], Alemanha), antes da colpocitologia. Posteriormente, a colpocitologia foi realizada utilizando-se uma escova ginecológica introduzida através da comissura dorsal da vagina, em ângulo de 45° em relação ao solo, até a região dorso-cranial da vagina, fazendo-se movimentos rotatórios.

As lâminas foram coradas no Laboratório de Reprodução Animal do Hospital de Medicina Veterinária Prof. Renato Rodenburg de Medeiros Neto- HOSPMEV da Universidade Federal da Bahia (UFBA), com corante do tipo Panótipo Rápido (Corante Rápido, Renylab, Barbacena, Brasil), sendo analisadas imediatamente após a coloração.

Cada lâmina foi observada utilizando-se microscopia de luz comum com aumento de 400x, sendo avaliada a porcentagem de células parabasais, intermediárias e superficiais. Conforme essa avaliação, as fêmeas foram classificadas de acordo com a fase do ciclo estral: proestro, estro, diestro e anestro. A fase do estro foi identificada quando o esfregaço celular apresentou um índice de cornificação (células superficiais) superior a 80%. Após essa identificação, a vitamina C foi administrada por um período de seis dias.

Análise estatística

A identificação do sexo dos filhotes foi realizada ao nascimento. A proporção do sexo obtida dos animais submetidos à dieta suplementada com vitamina C foi comparada com a proporção do sexo esperada de 1:1. Para a análise dos resultados utilizou-se o programa SAS for Windows (Versão 9.0 for Windows; SAS Inst., Cary, NC) utilizando-se o teste do Qui-quadrado e adotando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes da administração do ácido ascórbico, as cadelas apresentaram um pH vaginal em torno de 6,5-7,0. A análise do pH da mucosa vaginal das cadelas pertencentes ao canil 1

demonstrou que 92% das cadelas (23/25) apresentaram pH entre 5,5-5,8. No grupo 2 observou-se em 87% das cadelas (13/15), valores de pH entre 6,4-6,0. Em ambos os grupos avaliados, o pH apresentou redução na alcalinidade.

A Tab. 01 demonstra a média da proporção do sexo dos animais nascidos, provenientes dois canis, em que foi administrado o ácido ascórbico, em relação à proporção esperada de 1:1, ou seja, 50% de probabilidade de nascer macho ou fêmea. Dos animais avaliados, 5% (2/38) apresentaram 4 filhotes, 79% (30/38) obtiveram três filhotes e 16% (6/38) apenas dois filhotes.

Pode-se notar nesses resultados, que apesar do total de nascimentos demonstrar um aumento da proporção do número de fêmeas, comparando-se ao grupo controle, não houve desvio significativo da proporção do sexo ($p > 0,05$).

Tabela 01: Proporção do sexo obtida em cadelas submetidas ao tratamento com ácido ascórbico nos canis 01 e 02.

Grupo	Fêmeas n (%)	Machos n (%)	Total	Valor de p
Vitamina C	64 (58,0%)	46 (42,0%)	110	0,34051
Proporção esperada 1:1	55 (50%)	55 (50%)	110	

O desvio da proporção sexual tem grande aplicabilidade nos programas de reprodução assistida visando o melhoramento genético e a produtividade. Uma possibilidade para atingir esse objetivo seria por meio de processos diferenciais de transporte dos espermatozoides X e Y no trato reprodutivo da fêmea, que estão intimamente associados a fatores como momento da inseminação, idade da fêmea, características do muco cervical, balanço de nutrientes nas secreções do trato genital e o pH vaginal (ROSENFELD e ROBERTS, 2004).

Na busca da otimização da seleção genética, nosso estudo buscou promover o desvio da proporção sexual, por meio da acidificação do muco vaginal em cadelas utilizando o ácido ascórbico, trazendo dados inovadores sobre a fisiologia reprodutiva da fêmea canina. Com base em nossos resultados, foi possível monitorar as características do muco vaginal da fêmea no momento do acasalamento e demonstrar a associação do uso desse antioxidante com a taxa de proporção sexual.

Estudos avaliando os valores de pH nas secreções vaginais nas cadelas são escassos e os resultados variam independentemente da forma como a medição é realizada: com um medidor de pH (pHmetro) ou uma fita indicadora. De acordo com Oliveira *et al.* (1998), o valor de pH pode sofrer variação de acordo com a fase do ciclo estral apresentando-se entre 5,5 a 6,5 durante as fases de proestro e estro, 7 a 8,5 na fase de diestro e entre 7,8 a 8,5 na fase de anestro. Essa variação também é observada em outras espécies. Em bovinos, observa-se no proestro valores de 7,4 que diminuem para 6,9 no estro e aumentam para 7,2 a 7,4 no diestro (EL-NAGGAR e BAKSAI- HORVÁTH, 1971).

Segundo Antonov *et al.* (2014), os valores de pH vaginal na cadela demonstram uma significativa redução no momento da ovulação, variando entre 6,5 a 6,8. Os resultados do presente trabalho, demonstraram parâmetros similares aos valores de pH relatados para a fase de proestro e estro, demonstrando-se pequena variação entre os diferentes canis avaliados.

Outros fatores podem ser responsáveis pela modificação na proporção entre os sexos da prole, como o momento da inseminação artificial (IA).

O controle fisiológico do sexo da cria parece estar relacionado com a capacitação espermática. A seleção do sexo pode ocorrer no ambiente uterino onde, após a IA os espermatozoides carreadores do cromossomo Y capacitam-se mais cedo. Isto ocorre devido à maior sensibilidade à concentração iônica no útero em relação aos espermatozoides que contêm o cromossomo X. Dessa forma, quando a IA ocorre precocemente os espermatozoides Y são capacitados mais cedo e grande parte pode não resistir até a chegada do oócito na ampola uterina. Já os espermatozoides X sobrevivem, já que são capacitados mais tardiamente e conseguem fertilizar o oócito (PELLEGRINO *et al.*, 2003).

Por outro lado, quando o desejável é obter maior nascimento de filhotes do sexo masculino, deve-se atentar ao fato de que quanto mais tardiamente ocorre a inseminação, mais avançada é a idade do oócito, o que dificulta ou impossibilita a fertilização. Assim, de acordo com essa hipótese, quanto mais cedo ocorrer a IA, maior a probabilidade de produtos fêmeas enquanto mais tarde ou mais próximo da ovulação, maior a chance de nascimento de machos (PELLEGRINO *et al.*, 2003).

Estudos realizados em ovinos verificaram que acasalamentos ocorridos próximo ao início do estro produziam maior proporção de fêmeas e que acasalamentos tardios produziam maior proporção de machos (GUTIERREZ-ADAM *et al.*, 1999). Em bovinos, os resultados são controversos. Enquanto alguns autores relatam influência significativa na razão sexual das crias com o momento da inseminação (MARTINEZ *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2008), em outros estudos não foram observadas diferenças (ROELOFS *et al.*, 2006). Pratt *et al.* (1987) observaram maior proporção de machos nascidos de acasalamentos ocorridos no final do estro em hamsters com o pH vaginal alcalino.

Os canídeos, apresentam especificidades reprodutivas que os diferenciam de outras espécies domésticas. A cadela apresenta a particularidade de liberar oócitos imaturos, ou seja, no início da primeira divisão meiótica (prófase I) em estágio de vesícula germinativa (VG), portanto ainda não fecundáveis. Esses oócitos devem permanecer na tuba uterina por mais 48 horas, aproximadamente, para atingirem o estágio de maturação com a quebra da VG para serem fecundáveis (CONCANNON, 2011). Além disso, o ambiente endócrino na ovulação na cadela é muito diferente do observado em outras espécies domésticas, uma vez que os folículos são submetidos a uma luteinização pré-ovulatória após o pico do hormônio luteinizante (LH) e a progesterona sérica já ter atingido altos níveis na ovulação (REYNAULD *et al.*, 2005).

No presente estudo, o tratamento com a vitamina C e o acasalamento foi realizado durante um período de cinco dias após a aceitação da monta. A fase do estro nos canídeos pode variar de 3 a 21 dias, com uma média de 9 dias. Assim, como a concentração hormonal no ambiente endócrino apresenta grande variação durante o início e final desse período e os níveis hormonais dos esteroides podem influenciar nos valores de pH das secreções vaginais, o momento do acasalamento pode ser um fator significativo e deveria ser considerado em novos estudos. Além disso, sugere-se que os níveis hormonais de ambos os pais, no momento da concepção, são parcialmente responsáveis pela variação da proporção do sexo, especialmente o nível de testosterona (GÓRECKI, 2003). Dessa forma, uma dosagem hormonal, com um

acompanhamento durante o período de acasalamento poderia fornecer mais dados consistentes sobre essa teoria.

Em peixes (*Carassius auratus*), foi demonstrado que, a longo prazo, a progesterona pode afetar a transcrição de genes associados às vias de sinalização do ritmo circadiano e eixo hipotalâmico-hipófise-gonadal, ocasionando perturbações endócrinas e impactos na diferenciação sexual (WANG *et al.*, 2020). Nos canídeos, a fase do estro é caracterizada pela inversão na concentração hormonal com elevação da concentração de progesterona que aumenta rapidamente acima de 1-3ng/mL durante o pico pré-ovulatório de LH e segue aumentando, atingindo 10-25ng/mL até o dia 10, logo após o final do estro. Essa concentração permanece alta durante toda a fase de diestro, sendo semelhante entre animais gestantes e não gestantes. Dessa forma, o estudo da influência dos hormônios na influência da proporção do sexo da prole deve ser melhor elucidado não só na cadela, mas também nas diferentes espécies domésticas e selvagens.

No momento da fertilização o pH vaginal pode desempenhar papel preponderante na seleção dos cromossomos X ou Y e conseqüentemente afetar a proporção sexual. Em estudo transcriptômico na espécie suína, utilizando inseminação laparoscópica bilateral, populações de cromossomos X ou Y foram introduzidas em dois ovidutos separadamente gerando respostas transcriptômicas diferentes (ALMIÑANA *et al.*, 2014). De acordo com esses autores, o oviduto poderia atuar como um sensor biológico que pode identificar o espermatozoide e proporcionar um ambiente modificado influenciando no gênero. Esses achados são particularmente importantes para os canídeos já que nessa espécie o oviduto tem um papel diferenciado.

Foi demonstrado que há associação, nas cadelas, entre os níveis hormonais de estradiol e o pH das secreções vaginais. As concentrações máximas de estrógeno observadas variaram de 50,13 a 123,47pg/mL e foram detectadas entre 5 a 9 dias após o início do proestro ou 2 a 5 dias antes da ovulação. No dia da ovulação, os níveis de estradiol foram significativamente baixos. No primeiro dia do proestro, os valores de pH das secreções vaginais variaram entre 7,4 a 8,7 atingindo os níveis mais baixos (6,5 a 7,7) no último dia dessa fase. Essa redução teve a sua continuidade durante o estro variando de 6,5 a 7,1 no início do estro e níveis de 6,5 a 6,8 no momento da ovulação (ANTONOV *et al.*, 2014).

No presente estudo, foram observados, nos animais obtidos do canil 01, valores de pH inferiores aos níveis descritos na literatura por Antonov *et al.* (2014). Esses dados demonstram que a concentração administrada de ácido ascórbico foi suficiente para promover a acidificação do muco vaginal no grupo 1 mas não nos animais provenientes do grupo 2. Entretanto, essa acidificação pode ser decorrente não apenas da administração do ácido ascórbico, mas também da influência hormonal característica dessa fase do ciclo estral e que é bastante peculiar entre cadelas de diferentes raças e indivíduos da mesma raça.

Muri (2004) demonstrou, na espécie canina, que a administração de 10mg/kg de ácido ascórbico, a cada 8 a 12 horas antes da cobertura até 24h após a última cobertura, proporcionou uma média de nascimentos de 61% de fêmeas no grupo tratamento e 37% no grupo controle, havendo desvio significativo na proporção do sexo. Entretanto, apesar dessa autora afirmar que a alteração do pH do trato reprodutivo da fêmea favoreceu os espermatozoides de um determinado sexo, as fitas reativas de pH utilizadas não foram sensíveis para uma avaliação precisa e apenas 15 nascimentos foram avaliados. No presente estudo, foi utilizada a

concentração de 516,8mg, duas vezes ao dia, e 120 nascimentos foram avaliados. Entretanto, apesar de comprovarmos a acidificação do pH do muco vaginal, sugere-se que outros fatores podem influenciar na taxa da proporção sexual já que houve maior nascimento de fêmeas, porém essa diferença não foi significativa.

Estudos em humanos demonstraram resultados positivos para enriquecimento de espermatozoides portadores do cromossoma X, após incubação em meio ácido, aumento de temperatura e níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS), sugerindo o potencial para a sexagem do sêmen, explorando-se diferentes parâmetros fisiológicos (OYEYIPO *et al.*, 2017). Em javalis, observou-se que em pH externo alto, o pH interno aumenta e a motilidade dos espermatozoides epididimários é iniciada (SUAREZ e PACEY, 2006). Entretanto, em bovinos, a proporção da migração de espermatozoides X ou Y, durante o procedimento de *swim-up*, não foi influenciada pelo pH do meio (RAVAL *et al.*, 2019).

Em suínos, Morato (2008) observou que a diferença na proporção de fêmeas nascidas entre os grupos controle e tratamento não foi significativa no grupo que recebeu 10g/kg/matriz/dia de vitamina C. Entretanto, quando administrado 24g/kg matriz/dia de vitamina C, houve desvio da proporção sexual com um maior nascimento de fêmeas. Com base nos achados do nosso estudo e correlacionando com os achados da literatura em outras espécies domésticas, pode-se afirmar que os níveis de vitamina utilizados, nesse estudo, não foram suficientes para acidificar o pH vaginal a ponto de desviar a proporção sexual já que os valores obtidos ficaram próximos ao descrito na literatura referente à essa fase do ciclo estral decorrentes da influência hormonal. Dessa forma, pode ser necessário uma dose mais elevada para promover o desvio sexual na espécie canina.

Estudos em mulheres vêm demonstrando que o ácido ascórbico pode ser utilizado como uma abordagem terapêutica acidificante para modificar a flora vaginal em casos de vaginoses bacterianas, por meio da administração de comprimidos intravaginais na dosagem de 250mg. A administração de vitamina C é considerada um dos meios mais eficazes, nas mulheres, em manter o pH vaginal abaixo de 4,5 sendo eficaz no tratamento das vaginoses por meio da produção de ácido láctico (ZODZIKA *et al.*, 2013; KRASNOPOLSKYA *et al.*, 2015; MOHAMMAD-ALIZADEH *et al.*, 2017). No presente trabalho, os resultados observados nas diferentes espécies domésticas, a administração da vitamina C ocorreu de forma oral. Esses achados levantam a hipótese que talvez a forma de administração dessa vitamina possa influenciar nos resultados já que por via oral ocorre o processo de metabolização e consequentemente uma possível diminuição de sua eficácia.

Um outro fator importante que pode influenciar na proporção do sexo da prole é o número de parição. Estudo desenvolvido com cães selvagens africanos (*Lycan pictus*) demonstrou que fêmeas primíparas possuem forte tendência a favor de filhotes machos (63%), enquanto as fêmeas múltiparas produzem um excesso de filhas (64%), o que mostra a influência da raça e do número de partições (CREEL *et al.*, 1997). Nesse trabalho, todas as cadelas avaliadas eram primíparas e não houve desvio significativo ($p > 0,05$) na proporção do sexo nos nascimentos observados. Entretanto, apesar da fisiologia reprodutiva de canídeos selvagens serem similares aos domésticos, sabe-se que diversos fatores podem influenciar na reprodução desses animais.

Tedor e Reif (1978) observaram que várias raças, incluindo Pastor Alemão mostraram maior proporção de sexos do que o esperado, enquanto outras apresentaram proporção sexual menor do que o esperado, sugerindo que a raça poderia afetar o desvio da proporção sexual em cães. De forma, similar, Gharagozlou *et al.* (2016) identificaram alta proporção de machos na ninhada de cães da raça Husky Siberiano (62,4%) quando comparado à raça Pastor Alemão (50%). Apesar desses fatores não terem sido mensurados em nosso estudo, foi observado taxa similar de nascimentos na proporção de macho: fêmea entre os animais das diferentes raças. Entretanto, os canídeos apresentam particularidades reprodutivas que são únicas entre as diversas espécies domésticas e sabe-se que fatores hormonais, nutricionais, genéticos e até mesmo individuais podem influenciar na taxa de ovulação e sucesso reprodutivo desses animais.

Rosenfeld e Roberts (2004), Gutierrez-Adan *et al.* (2006), Aurich e Scheneider (2014) e Booksmythe *et al.* (2017) consideram a idade dos pais como fator relevante para a proporção sexual ao nascimento. De acordo com Trivers e Willard (1973), mães mais velhas tendem a gerar mais fêmeas por causa da alta mortalidade dos espermatozoides Y e/ou embriões XY dentro do trato genital feminino e que este controle da sobrevivência do embrião ocorre provavelmente por meio do metabolismo da glicose na mãe.

Por outro lado, Martins *et al.* (2019) demonstraram que a idade da cadela e o tamanho da ninhada interagem para determinar a proporção sexual da prole e são fatores que não devem ser analisados independentemente. A idade da cadela não foi avaliada nesse estudo, porém foi avaliada uma amostra heterogênea com faixa etária de dois a cinco anos. Os resultados do presente estudo, demonstraram a influência do pH da mucosa vaginal e pode-se concluir que apenas um fator não é responsável pela proporção do sexo ao nascimento, mas sim um conjunto de fatores interligados. Entretanto, os resultados com canídeos ainda são escassos e com resultados controversos, necessitando de maiores investigações para esclarecer os fatores responsáveis pela determinação do sexo.

Em peixes, o fator ambiental exerce forte influência na proporção do sexo e à exposição à altas temperaturas pode resultar em aumento no nascimento de machos. Além da temperatura e do pH, outros fatores ambientais podem interferir como: densidade populacional, hipóxia e a presença de distúrbios endócrinos. As respostas às mudanças ambientais são mediadas por mecanismos epigenéticos, que possuem o potencial e modular a expressão gênica (KRONHOLM e COLLINS, 2016).

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais estudado envolvido na aquisição do fenótipo sexual durante o processo de desenvolvimento gonadal, entretanto modificações nas histonas ou regulação por microRNAs também desempenham função preponderante (PIFERRER, 2013; PIFERRER, 2016). Valdivieso *et al.* (2020) demonstraram a influência da temperatura na metilação do DNA em testículos de peixes identificando diferenças entre famílias. Dessa forma, deve-se considerar uma série de fatores quando se é avaliada a proporção sexual, ainda mais quando se trata dos canídeos já que estes possuem particularidades reprodutivas únicas que sofrem influências hormonais, genéticas, raciais, ambientais e individuais.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos com o presente experimento, conclui-se que a administração oral de vitamina C não atuou como um método eficaz para desvio da proporção do sexo para fêmeas. Diversos estudos vêm sendo realizados com esse intuito, mas os resultados mostram-se duvidosos e até mesmo conflitantes. Dessa forma, outros estudos devem ser desenvolvidos para tentar determinar se há realmente a influência do pH vaginal sobre a proporção do sexo e como é possível constatar se de fato houve essa acidificação, já que vários estudos apesar de ter atribuído a seleção do sexo a esse fator, não conseguiram de fato mensurar essa alteração. Sugere-se também que estudos sejam desenvolvidos com o objetivo de demonstrar não só o metabolismo, mas os efeitos do ácido ascórbico nessa espécie, principalmente em relação ao sistema genital.

REFERÊNCIAS

- ALMIÑANA, C.; CABALLERO, I.; HEATH, P.R.; MALEKI-DIZAJI, S.; PARRILLA, I.; CUELLO, C.; GIL, M.A.; VAZQUEZ, J.L.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A.; AND HOLT, W.V.; FAZELI, A. The battle of the sexes starts in the oviduct: Modulation of oviductal transcriptome by X and Y-bearing spermatozoa. **BMC Genomics**, v.15, n.1, p.293-303, 2014.
- ANTONOV, A.Z.; DINEVA, J.D.; GEORGIEV, P.I. Dynamics of Vaginal pH in the Bitch during Proestrus and Estrus. **Animal and Veterinary Sciences**, v.2, n.4, p.101-104, 2014.
- AURICH, C.; SCHNEIDER, J. Sex determination in horses e current status and future perspectives. **Animal Reproduction Science**, v.146, n.1/2, p.34-41, 2014.
- BERRY, D.P.; KEARNEY, J.F.; ROCHE, J.R. Evidence of genetic and maternal effects on secondary sex ratio in cattle. **Theriogenology**, v.75, n.6, p.1039-1044, 2011.
- BOOKSMYTHE, I.; MAUTZ, B.; DAVIS, J.; NAKAGAWA, S.; JENNIONS, M.D. Facultative adjustment of the offspring sex ratio and male attractiveness: a systematic review and meta-analysis. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v.92, n.1, p.108-134, 2017.
- CAMERON, E.Z.; EDWARDS, A.M.; PARSLEY, L.M. Developmental sexual dimorphism and the evolution of mechanisms for adjustment of sex ratios in mammals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1389, n.1, p.147-163, 2017.
- CONCANNON, P.W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science**, v.124, n.3/4, p.200-210, 2011.
- CREEL, S.; CREEL, N.M.; MILLS, M.G.L.; MONFORT, S.L. Rank and reproduction in cooperatively breeding African wild dogs: behavioral and endocrine correlates. **Behavioral Ecology**, v.8, n.3, p.298-506, 1997.
- EL-NAGGAR.; BAKSAI-HORVATH. Studies of physical and Chemical properties of bovine cervical mucus during pregnancy. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v.21, n.2, p.245-253, 1971.

Recebido: set./2021.

Publicado: set./2023.

GARNER, D.L.; SEIDEL Jr. G.E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, v.69, n.7, p.886-895, 2008.

GHARAGOZLOU, F.; YOUSSEFI, R.; AKBARINEJAD, V. Effects of diets supplemented by fish oil on sex ratio of pups in bitch. **Veterinary Research Forum**, v.7, n.2, p.105-110, 2016.

GÓRECKI, M.T. Sex ratio in litters of domestic pigs. **Biology Letters**, v.40, n.2, p.111-118, 2003.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ-GARNELO, S.; GRANADOS, J.; GARDE, J.J.; PÉREZGUZMÁN, M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte. **Theriogenology**, v.7, n.1, p.37-43, 1999.

GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-CRESPO, M.; FERNANDEZ-GONZALEZ, R.; RAMIREZ, M.A.; MOREIRA PINTADO, B.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. Developmental consequences of sexual dimorphism during pre-implantation embryonic development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, n.2, p.54-62, 2006.

HARDY, I.C.W. Possible factors influencing vertebrate sex ratios: introductory overview. **Applied Animal Behaviour Science**, v.51, n.3, p.217-41, 1997.

HEULE, C.; SALZBURGER, W.; BÖHNE, A. Genetics of sexual development: an evolutionary playground for fish. **Genetics**, v.196, n.3, p.579-591, 2014.

HOLST, P.A.; PHEMISTER, R.D. The prenatal development of the dog. preimplantation events. **Biology of Reproduction**, v.5, n.2, p.771-779, 1971.

KRASNOPOLSKY, V.N.; PRILEPSKAYA, V.N.; POLATTI, F.; ZAROCHEVSEVA, N.V.; BAYRAMOYA, G.R.; CASERINI, M.; PALMIERI, R. Efficacy of Vitamin C Vaginal Tablets as Prophylaxis for Recurrent Bacterial Vaginosis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. **Journal of Clinical Medicine Research**, v.5, n.4, p.309-315, 2013.

KRONHOLM, I.; COLLINS, S. Epigenetic mutations can both help and hinder adaptive evolution. **Molecular Ecology**, v.25, n.8, p.1856-1868, 2016.

MARTINEZ, F.; KAABI, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; PAZ, P.; ANEL, L. Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a field study. **Theriogenology**, v.62, n.7, p.1264-1270, 2004.

MARTINS, A.C.; VAZ, M.A.; MACEDO, M.M.; SANTOS, R.L.; GALDINO, C.A.B.; WENCESLAU, R.R.; VALLE, G.R. Maternal age, paternal age, and litter size interact to affect the offspring sex ratio of German Shepherd dogs. **Theriogenology**, v.135, p.169-173, 2019.

MOHAMMAD-ALIZADEH, S.; DOKHANCHI, T.; HAKIMI, S.; JAVADZADEH, Y.; TAKALLU, L.; GHARABAGHI, P.M. The Addition of Vitamin C Vaginal Tablets to Oral Metronidazole and its Effect on the Treatment and Recurrence of Bacterial Vaginosis: A Randomized Triple-Blind Clinical Trial. **International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences**, v.5, n.3, p.193-199, 2017.

MORATO, F.M.A.C. **Desvio da proporção sexual por meio da suplementação de fêmeas suínas com ácido ascórbico e sua influência na resposta à seleção**, 2008. 71p. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias de Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

MURI, A.H. **Administração de ácido ascórbico por via oral em cadelas em estro para aumentar a proporção de nascimento de fêmeas em relação aos machos**, 2004, 47p. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias de Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

OYEYIPO, I.P., VAN DER LINDE, M.; DU PLESSIS, S.S. Environmental exposure of sperm sex-chromosomes: A gender selection technique. **Toxicology Research**, v.33, n.4, p.315-323, 2017.

OLIVEIRA, C.; COSTA, E.; SILVA, J. The vaginal pH of healthy bitches during the oestrus cycle. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, p.32-34, 1998.

PELLEGRINO, C.A.G.; HE NRY, M.; JACOMINI, J.O.; DINIZ, E.G. Aplicações da mensuração da resistência elétrica do muco vaginal no manejo reprodutivo de fêmeas bovinas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.4, p.660-668, 2003.

PIFERRER, F. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. **Developmental Dynamics**, v.242, n.4, p.360–370, 2013.

PIFERRER, F. Altered sex ratios in response to climate change —Who will fall into the (epigenetic) trap? **Bioessays**, v.38, n.10, p.939-939, 2016.

PRATT, N.C.; HUCK, U.W.; LISK, R.D. Offspring sex ratio in hamsters is correlated with vaginal ph at certain times of mating. **Behavioral and Neural Biology**, v.48, n.2, p.310-316, 1987.

RAVAL, N.P.; SHAH, T.M.; GEORGE, L.B.; JOSHI, C.G. Effect of the pH in the enrichment of X or Y sex chromosome-bearing sperm in bovine. **Veterinary World**, v.12, n.8, p.1299-1303, 2019.

REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; VIARIS DE LESEGNO, C.; CHASTANT MAILLARD, S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**, v.130, n.2, p.193-201, 2005.

ROELOFS, J.B.; BOUWMAN, E.B.; PEDERSEN, H.G.; RASMUSSEN, Z.R.; SOEDE, N.M.; THOMSEN, P.D.; KEMP, B. Effect of time of artificial insemination on embryo sex ratio in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v.93, n.3/4, p.366-371, 2006.

ROSENFELD, C.S.; ROBERTS, R.M. Maternal diet and other factors affecting offsprings sex ratio: a review. **Biology of Reproduction**. v.7, n.4, p.1063-1070, 2004.

SHETTLES, L.B. Factors influencing sex ratios. **Gynecology & Obstetrics**, v.8, n.5, p.643-647, 1970.

SILVA, A.E.F.; DIAS, M.J.; DIAS, D.S.O.; DUARTE, J.B.; ANDRADE, J.R. A. Influência do momento da inseminação artificial sobre a fertilidade e o sexo da cria de novilhas da raça nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.4, p.997-1003, 2008.

SUAREZ, S.S.; PACEY, A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, v.12, n.1, p.23-37, 2006.

TEDOR, J.B.; REIF, J.S. Natal patterns among registered dogs in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.172, n.2, p.1179-1185, 1978.

TRIVERS, R.L.; WILLARD, D.E. Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. **Science**, v.179, n.4068, p.90-92, 1973.

TSUTSUI, T. Studies on the reproduction in the dog on cleavage and transport of fertilised ova in the oviduct. **The Japanese Journal Animal Reproduction**, v.21, n.2, p.70-75, 1975.

VALDIVIESO, A.; RIBAS, L.; MONLÉON-GETINO, A.; ORBÁN, L.; PIFERRER, F. Exposure of zebrafish to elevated temperature induces sex ratio shifts and alterations in the testicular epigenome of unexposed offspring. **Environmental Research**, v.186, p.109601-109610, 2020.

WANG, P.; SUN, Q.; WAN, R.; DU, Q.; XIA, X. Progesterone affects the transcription of genes in the circadian rhythm signaling and hypothalamic-pituitary-gonadal axes and changes the sex ratio in crucian carp (*Carassius auratus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.77, p.103378, 2020.

ZODZIKA, J.; REZEBERGA, D.; DONDEERS, G.; VEDMEDOVSKA, N.; VASINA, O.; PUNDURE, I.; BITE, R.; SILBERGA, I.; SOCENOVA, J.; MELNGAILE, O. Impact of vaginal ascorbic acid on abnormal vaginal microflora. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v.288, n.5, p.1039-1044, 2013.