



**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Dissertação

**Relação entre o manejo reprodutivo na cadela e as datas de  
beneficiação e de parto**

**Mariana Beatriz Teixeira Mendes**

Orientador(es) | Rita Payan-Carreira  
Ricardo Jorge Romão  
Diana Meireles do Espírito Santo

Évora 2024





**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Dissertação

**Relação entre o manejo reprodutivo na cadela e as datas de  
beneficiação e de parto**

**Mariana Beatriz Teixeira Mendes**

Orientador(es) | Rita Payan-Carreira  
Ricardo Jorge Romão  
Diana Meireles do Espírito Santo

Évora 2024

---

---

---

---

---



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Sónia Lucena (Universidade de Évora)

Vogais | Maria da Graça Cunha Antunes Lopes (Universidade do Porto - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar) (Arguente)  
Rita Payan-Carreira (Universidade de Évora) (Orientador)

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer à Professora Doutora Rita Payan Carreira, por ter aceitado orientar-me nesta fase, por toda a ajuda e disponibilidade para responder às minhas dúvidas e pela sua dedicação.

Ao meu coorientador Professor Doutor Ricardo Romão, pela disponibilidade e por toda a ajuda neste percurso.

A toda a equipa do HVSM, obrigada por me terem recebido tão bem durante os 5 meses de estágio, pelos bons momentos e todos os conhecimentos que me transmitiram. Um especial agradecimento à minha orientadora Dr<sup>a</sup> Diana Meireles, pelo acompanhamento ao longo de toda a recolha de dados necessários para esta dissertação de mestrado e por todos os conhecimentos transmitidos durante o estágio. Um muito obrigado a todos os enfermeiros veterinários do hospital, pela ajuda na recolha de dados. Um enorme agradecimento a todos os médicos veterinários que me acompanharam, neste período, em especial ao Dr. Vasco Braga e à Dr<sup>a</sup> Beatriz Leite.

Às minhas amigas Eduarda, Filipa, Nídia e Inês, pela sua amizade, pelos bons momentos passados em Évora e por todos os outros fora disso, por todo o apoio e ajuda que me deram ao longo destes 6 anos e por me terem motivado sempre.

Por fim, o maior agradecimento é para a minha família, pais, irmã, madrinha e tia, que sempre me motivaram a seguir o meu sonho, por me ajudarem em tudo, apesar de todas as dificuldades e sem eles nada disto seria possível.

## **Resumo - Relação entre o manejo reprodutivo na cadela e as datas de beneficiação e de parto**

Este trabalho aborda a identificação do período fértil de cadelas através do doseamento sérico de progesterona e de citologias vaginais, para determinar o melhor momento para beneficiar. Neste tema incluiu-se um estudo realizado em 11 cadelas, em que, com base nos resultados citológicos e endócrinos, se determinou o período fértil das cadelas para maximizar a fertilidade da beneficiação. Destas, nove cadelas ficaram gestantes. Avaliou-se ainda a relação entre a duração da gestação e do tipo de beneficiação sobre o tamanho da ninhada. Não foi possível estabelecer uma correlação significativa entre a duração da gestação e o tamanho da ninhada nem entre o tipo de beneficiação e o tamanho da ninhada na amostra em estudo ( $p= 0,345$ ). A determinação do período fértil é uma ferramenta útil para aumentar a eficácia na obtenção de uma gestação.

**Palavras-chave:** Progesterona, Citologia vaginal, Período fértil, Ciclo éstrico, Gestante

## **Abstract - The relationship between reproductive management in bitches and the dates of whelping and parturition**

This work addresses the identification of the fertile period of bitches through serum progesterone measurement and vaginal cytology, to determine the best time to breed. This topic included a fertility study conducted on 11 female dogs, using both cytological and endocrine analysis to identify their optimal breeding periods. The study resulted in successful pregnancies in nine of the animals. The relationship between the duration of gestation and the type of breeding on the size of the litter was also evaluated. It was not possible to establish a significant correlation between the duration of gestation and litter size nor between the type of breeding and litter size in the sample under study ( $p= 0.345$ ). Determining the fertile period is a useful tool to increase the effectiveness of obtaining a pregnancy.

**Keywords:** Progesterone, Vaginal cytology, Fertile period, Estrous cycle, Pregnant

## Índice

Agradecimentos .....	I
Resumo - Clínica e cirurgia de animais de companhia .....	II
Abstract - Clinic and surgery of companion animals .....	III
Índice de Figuras .....	VI
Índice de Tabelas .....	VI
Índice de Gráficos .....	VII
Lista de abreviaturas .....	VIII
1. Introdução .....	1
2. Fisiologia e endocrinologia da reprodução de cadelas.....	1
2.1 O ciclo éstrico na cadela .....	2
2.1.1 Ovulação.....	3
3. Determinação do período fértil .....	5
3.1 Alterações comportamentais e físicas.....	7
3.2 Concentrações hormonais .....	8
3.2.1 Determinação dos valores de LH .....	9
3.2.2 Determinação dos valores de Progesterona.....	9
3.3 Vaginoscopia e endoscopia vaginal.....	12
3.4 Citologia vaginal .....	13
3.4.1 Interpretação da citologia vaginal.....	14
4. Gestação .....	20
4.1 Diagnóstico de gestação .....	21
4.2 Previsão da data de parto .....	22
4.2.1 Data das beneficiações.....	22
4.2.2 Alterações hormonais e citologia vaginal.....	22
4.2.3 Ecografia e Radiografia .....	23

5. Objetivos.....	23
6. Material e métodos.....	24
6.1 Recolha de amostras .....	25
6.1.1 Doseamento sérico da progesterona .....	25
6.1.2 Citologia Vaginal.....	26
6.1.3 Identificação do período fértil .....	26
6.1.4 Beneficiação.....	27
6.1.5 Diagnóstico de gestação e estimação da data de parto .....	28
6.2 Análise estatística.....	29
7. Resultados.....	29
7.1 Raça e idade.....	29
7.2 Relação entre os valores de progesterona e a citologia vaginal .....	30
7.3 Beneficiação.....	31
7.4 Tamanho da ninhada .....	33
7.5 Relação entre a duração da gestação e o tamanho da ninhada .....	34
7.6 Influência do método de beneficiação no tamanho da ninhada .....	35
8. Discussão .....	36
9. Conclusão .....	40
10. Referências bibliográficas .....	41
Anexos .....	45

## Índice de Figuras

Figura 1. Duração das fases do ciclo éstrico. ....	2
Figura 2. Ciclo reprodutivo da cadela, ilustrando o ambiente endócrino predominante em cada fase .....	3
Figura 3. Mecanismos endócrinos na regulação da regressão lútea em cadelas gestantes e não gestantes.....	5
Figura 4. Teste rápido de deteção de LH (Witness®).....	9
Figura 5. Valores comparativos de progesterona.....	11
Figura 6. Vaginoscopia vaginal em cadela. A. no proestro; B- no estro; C- no diestro; D - no anestro. ....	13
Figura 7. <i>Cluster</i> de células parabasais.....	15
Figura 8. Célula superficial com núcleo picnótico (à esquerda) e célula superficial anucleada (à direita).....	16
Figura 9. Células intermédias pequena (à esquerda) e grande (à direita) .....	16
Figura 10. Célula espumosa .....	16
Figura 11. Relação entre as alterações na parede vaginal, citologia vaginal e as fases do ciclo éstrico com os níveis de estrogénio.....	17
Figura 12. Citologia vaginal em cadela. A -em proestro; B- em fim de proestro.....	18
Figura 13. Citologia vaginal no estro.....	19
Figura 14. Citologia vaginal de cadela em diestro.....	20
Figura 15. Citologia vaginal de cadela em anestro.....	20

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Protocolos de diferentes tipos de colorações.....	14
Tabela 2. Períodos de maior fertilidade, para os diferentes tipos de beneficiação, desde o pico de LH.....	27
Tabela 3. Raça e idade das cadelas incluídas no estudo.....	30
Tabela 4. Resultados dos valores da progesterona e respetiva diagnóstico citológico ...	31
Tabela 5. Tipo de beneficiação e respetivas datas e diagnóstico de gestação .....	33
Tabela 6. Resultado da beneficiação e respetiva data do parto e tamanho da ninhada ...	33
Tabela 7. Data prevista para o parto, dia do parto e duração da gestação.....	35
Tabela 8. Método de beneficiação e respetivo tamanho da ninhada.....	36

## **Índice de Gráficos**

Gráfico 1. Distribuição das cadelas segundo o método de beneficiação a que foram sujeitas.....	32
Gráfico 2. Tamanho de ninhada por raça .....	34

## **Lista de abreviaturas**

Bpm: Batimentos por minuto

CAMVs: Centros de Atendimento Médico-Veterinários

CL: Corpo lúteo

CLIA: Chemiluminescent Immunoassay (imunoensaio quimioluminescente)

ELFA: Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ensaio fluorescente ligado a enzima)

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)

FSH: Follicle Stimulating Hormone (Hormona Folículo-Estimulante)

GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone (Hormona Libertadora de Gonadotrofina)

HVSM: Hospital Veterinário de Santa Marinha

IA: Inseminação Artificial

LH: Luteinizing Hormone (Hormona Luteinizante)

PGF2 $\alpha$ : Prostaglandina F2 $\alpha$

RIA: Radioimmunoassay (radioimunoensaio)

## **1. Introdução**

Nos dias de hoje, é cada vez mais frequente os tutores recorrerem aos centros de atendimento médico-veterinários (CAMVs) para a reprodução das suas cadelas, de modo a garantir uma monitorização mais apertada do ciclo éstrico, uma maior eficácia das beneficiações e, também uma melhor monitorização durante a gestação e no parto, diminuindo o número de fetos mortos e agindo rapidamente em casos de distócia. A presente dissertação foi elaborada com o objetivo de determinar a utilidade das medições dos níveis de progesterona no sangue e do uso de citologias vaginais para delimitar o período fértil, estimar a data do parto e analisar a relação entre alguns parâmetros reprodutivos nas cadelas, como o tamanho da ninhada, a duração da gestação e o tipo de beneficiação. Inicialmente é feita uma monografia sobre reprodução em cadelas, desenvolvendo um pouco a fisiologia e endocrinologia do ciclo éstrico, descrição dos métodos de determinação do período fértil e dos métodos de previsão da data do parto. Posteriormente, é feito o tratamento de dados recolhidos durante o estágio com o objetivo de inferir a relação entre a duração da gestação e o tamanho da ninhada e a influência do tipo de beneficiação no tamanho da ninhada.

## **2. Fisiologia e endocrinologia da reprodução de cadelas**

As cadelas são uma espécie monoéstrica não sazonal, ou seja, apenas possuem um ciclo éstrico por cada época reprodutiva. A puberdade define-se como o início da função reprodutiva numa fêmea e evidencia-se pelo, comumente, denominado “cio”. Na cadela, o termo “cio” engloba duas fases do ciclo éstrico, o proestro e o estro (Martins *et al.*, 2007). A idade a que a cadela atinge a puberdade é bastante variável e, apesar de ocorrer a uma idade média de nove meses, pode variar entre os seis e os 14 meses. No entanto, há algumas cadelas que a puberdade só ocorre mais tarde, por volta dos 24 aos 30 meses de idade. De facto, o início da puberdade parece estar associado à altura em que a cadela atinge, aproximadamente, 80% do peso adulto. Por esta razão, as raças gigantes tendem a atingir a puberdade numa idade mais tardia (England & Heimendahl, 2010).

## 2.1 O ciclo éstrico na cadela

O ciclo éstrico da cadela pode ser dividido em quatro estadios: proestro, estro, diestro e anestro, que têm duração bastante variável, de cadela para cadela. O proestro tem uma duração média de nove dias, variando de dois dias a três semanas. Em relação ao estro, a média é sete dias, variando dos sete dias às três semanas. O diestro tem em média, 60 dias de duração enquanto o anestro tem uma grande variação, que vai desde dois meses até dez meses de duração (Figura 1) (Kowalewski, 2018). É de referir, também, que o intervalo interéstrico, isto é, o tempo que decorre entre proestros sucessivos é, em média, de sete meses, mas pode variar entre os 4 e os 12 meses (Root Kustritz, 2010).

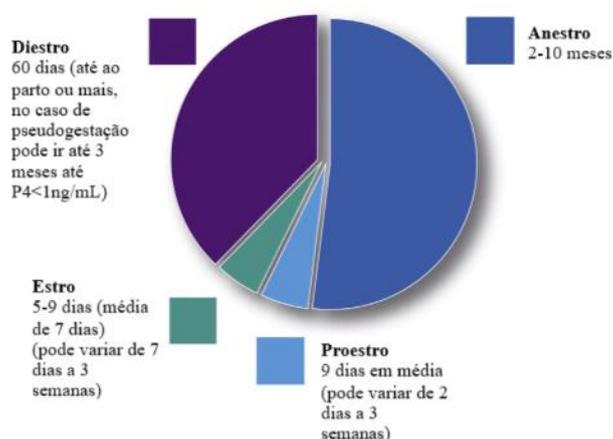


Figura 1. Duração das fases do ciclo éstrico. Adaptado de Kowalewski (2018)

Os quatro estadios do ciclo éstrico mencionados acima distribuem-se classicamente por três grandes fases, nomeadas de acordo com a estrutura dominante presente no ovário durante cada fase do ciclo. Estas fases são a fase folicular, a fase lútea e o anestro. A fase folicular corresponde ao período de desenvolvimento folicular até à ovulação, incorporando o proestro e o estro (cerca de 20% do ciclo éstrico). A fase lútea é o período que decorre desde a ovulação até à regressão do corpo lúteo e corresponde ao diestro (cerca de 80% do ciclo éstrico); o anestro é um período de quiescência, sem domínio de esteróides sexuais (Figura 2) (Senger, 2012).

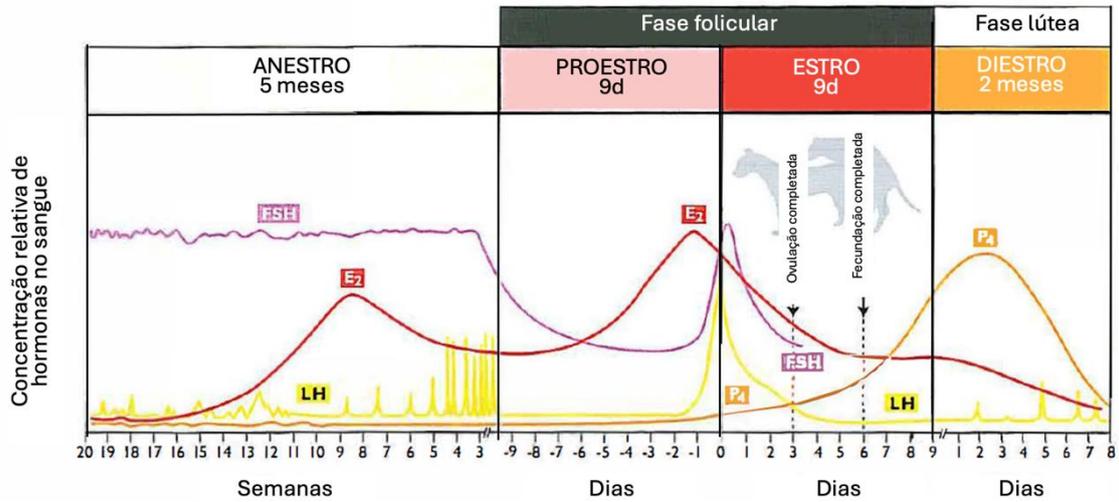


Figura 2. Ciclo reprodutivo da cadela, ilustrando o ambiente endócrino predominante em cada fase (Senger, 2012)

### 2.1.1 Ovulação

A cadela é uma espécie de ovulação espontânea, subsequente ao pico de LH, que ocorre cerca de 48 horas antes da ovulação. Uma característica da espécie é o facto de a ovulação ser precedida da luteinização da parede folicular, o que leva a um aumento significativo dos níveis plasmáticos de progesterona ainda antes de ocorrer a ovulação. Este aumento da progesterona acompanha o declínio dos níveis de estrogénios associado à conversão das células da granulosa mural em células lúteas. É esta inversão de valores entre os estrogénios e a progesterona que parece estimular o pico de LH, além de ser responsável pela alteração comportamental da cadela facilitando o comportamento de aceitação do macho (P. Concannon *et al.*, 1977).

As cadelas possuem uma grande variabilidade no que respeita ao dia da ovulação, e têm, normalmente, ovulações múltiplas. A maioria das ovulações ocorre num intervalo de 48 a 60 horas, após o pico de LH, mas alguns folículos podem levar até 96 horas para ovular (England & Heimendahl, 2010). Outra das características da espécie é o facto de o produto de ovulação ser um ócito primário, imaturo, e que requer um período de maturação nos ovidutos, que no caso da cadela é relativamente extenso.

O período fértil corresponde ao período de tempo, durante o qual a beneficiação pode resultar numa gestação, i.e., corresponde ao período de máxima fertilidade. Neste período inclui-se o período de fecundação, que corresponde ao tempo que os ócitos se encontram disponíveis para serem fecundados (England *et al.*, 2006). Na cadela, o período de

fecundação começa dois a três dias após a ovulação e estende-se até cerca de oito dias após a ovulação (Reynaud *et al.*, 2015). No fim deste período, a fertilidade da fêmea sofre um rápido declínio, devido à degenerescência dos oócitos e também ao encerramento do canal cervical (impedindo a entrada do sémen).

A fecundação só ocorre após a maturação dos oócitos primários, a extrusão do 1º corpo polar e a primeira divisão meiótica. Estes processos de maturação decorrem nos ovidutos e não estão completos antes de 48 horas pós ovulação. Por isso, tendo em conta que o intervalo entre o pico de LH e a ovulação é de 48 horas, pode concluir-se que a fecundação não ocorre antes do dia quatro pós-pico de LH (England & Heimendahl, 2010).

São vários os fatores que contribuem para a duração do período fértil da cadela, nomeadamente: o tempo de sobrevivência dos oócitos nos ovidutos (que é dois a três dias), o tempo entre a ovulação e a maturação dos oócitos (de dois a três dias) e o tempo de sobrevivência dos espermatozoides (vários dias, dependendo do tipo de beneficiação utilizado) (Martins *et al.*, 2007). Se a beneficiação a usar for a monta natural, o período fértil começa cerca de três dias antes do pico de LH e termina seis a oito dias depois, quando os oócitos começam a degenerar (England & Concannon, 2002).

A cadela possui ainda uma outra particularidade relativa ao seu ciclo éstrico, e que corresponde à duração do CL. Este apresenta uma longa duração, mantendo-se funcional durante sensivelmente o mesmo período, quer a cadela esteja gestante ou não. De facto, o diestro termina com o parto, no caso de uma cadela gestante, ou quando a progesterona é inferior a 1 ng/mL, no caso de cadelas não gestantes. Na prática, o decréscimo da progesterona circulante é mais gradual no final de um ciclo não gestacional do que num diestro de gestação, o que poderá alongar um pouco mais o diestro em fêmeas não gestantes. Em cadelas não gestantes, a luteólise parece ocorrer pelo “envelhecimento” do CL, não havendo evidências da existência de um mecanismo de luteólise semelhantes aos dos ruminantes (Kowalewski, 2014). Por outro lado, em cadelas gestantes a atividade do corpo lúteo parece ser interrompida pela ocorrência da luteólise pré-parto, associada a níveis crescentes de PGF2 $\alpha$  que causam a destruição do CL (Kowalewski, 2014). A Figura

3 esquematiza a diferença no mecanismo de regressão do corpo lúteo entre cadelas gestantes e não gestantes.

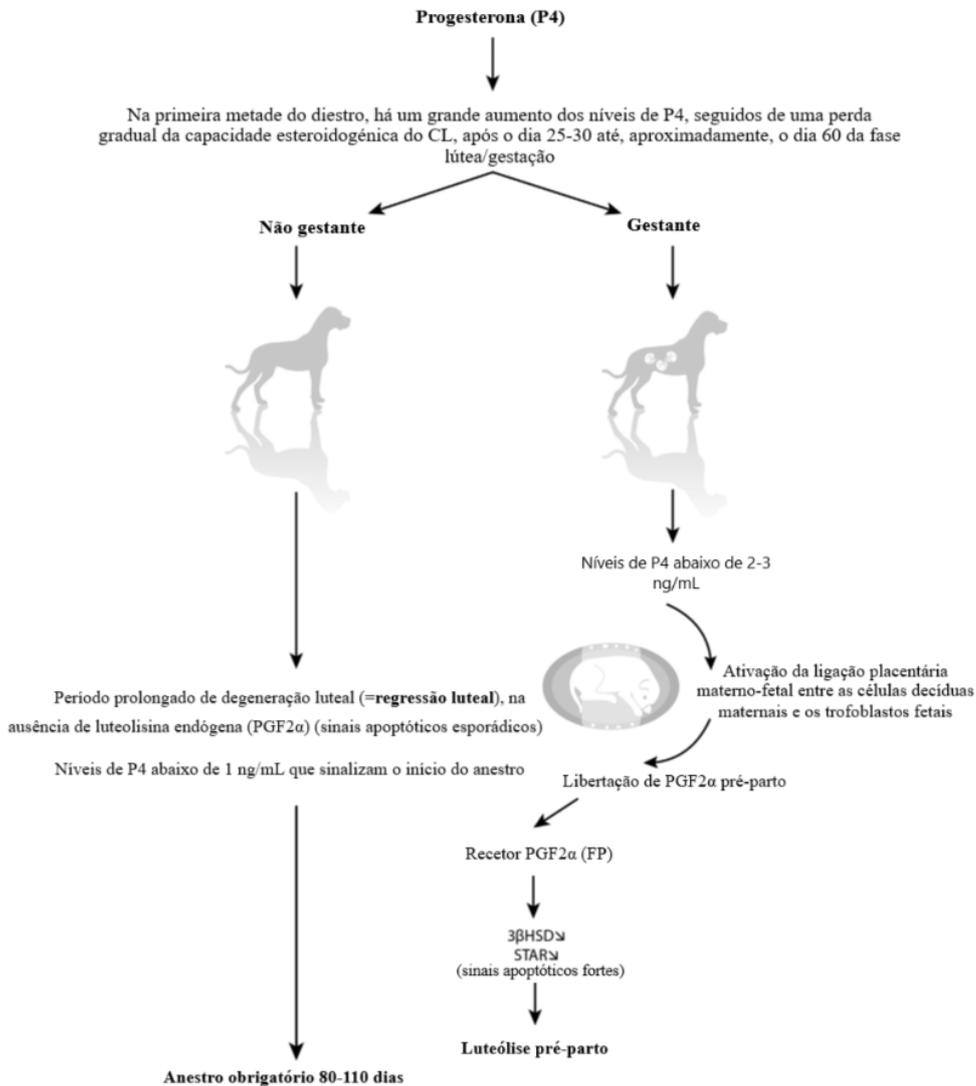


Figura 3. Mecanismos endócrinos na regulação da regressão lútea em cadelas gestantes e não gestantes. Adaptado de (Kowalewski, 2014)

No fim do diestro, a cadela passa por um período de anestro que dura cerca de três meses antes de iniciar um novo ciclo éstrico. Esta é uma fase de quiescência ovárica, mas intensa regeneração uterina (Noakes *et al.*, 2001).

### 3. Determinação do período fértil

A determinação do período fértil é a chave para aumentar a taxa de sucesso da gestação em cadelas. De facto, nestes animais é difícil determinar o período fértil. Existe uma grande variação no dia da ovulação, em relação ao aparecimento dos sinais clínicos

associados ao “cio” (designação que engloba as fases de proestro e estro), como edema vulvar e corrimento serosanguinolento (England & Concannon, 2002). Por vezes os tutores realizam a beneficiação da cadela a partir de um número de dias predeterminado após o aparecimento do corrimento sanguinolento. No entanto, se não houver cuidado na deteção do momento adequado para beneficiar a cadela, esta poderá não ficar gestante ou ter ninhadas muito pequenas; por consequência, muitas cadelas são consideradas como inférteis, quando na verdade, apenas foram beneficiadas no momento errado. Por isso, o momento da beneficiação e a forma como foi determinado deve sempre integrar a recolha de informação, numa consulta de infertilidade em cadelas (England & Concannon, 2002).

Como referido anteriormente, o período fértil é o tempo durante o qual a beneficiação pode resultar em gestação. Este período inclui não só o período de fecundação, mas também os dias que o precedem, uma vez que o sémen do macho pode sobreviver no trato reprodutivo da fêmea até nove dias, se a cadela for beneficiada por monta natural. Deste modo, o período fértil tem uma duração bastante variável: cerca do dia três antes do pico de LH até ao dia seis a oito após o pico de LH (Goodman, 2001). Em relação ao período de fecundação, a sua duração é muito mais curta, situando-se entre o dia quatro a seis após o pico de LH. De facto, o período ótimo para monta ou inseminação encontra-se por volta do dia quatro a seis pós pico de LH (Hewitt & England, 2000). É importante ter em conta a possibilidade de erro na determinação no dia da ovulação e do pico de LH, pelo que idealmente deve ser realizada mais do que uma beneficiação. Sendo possível realizar mais do que uma beneficiação, deve-se optar por uma margem de dois dias entre as beneficiações. Tendo em conta os tipos de beneficiação (monta natural vs. inseminação artificial com sémen fresco, refrigerado ou congelado) é necessário adaptar os dias para a beneficiação, porque há uma grande variabilidade na qualidade do sémen. Efetivamente, quando a beneficiação é feita por monta natural, os espermatozoides apresentam, normalmente, uma maior viabilidade. Porém, a qualidade do sémen é menor se usado em inseminação artificial, em particular se for sémen congelado. Assim, quanto menor a viabilidade e qualidade do sémen, maior tem de ser a precisão necessária para a deteção do dia da ovulação e para a seleção dos dias de beneficiação. Para determinar a melhor altura para a cobrição ou inseminação pode-se recorrer a vários métodos, incluindo a observação das alterações comportamentais e físicas, citologia vaginal, vaginoscopia e

endoscopia vaginal e a medição das concentrações circulantes de hormonas (Martins *et al.*, 2007).

### **3.1 Alterações comportamentais e físicas**

O comportamento sexual e os sinais clínicos, em cadelas, são bastante variáveis, tanto a nível individual como entre raças. Para determinar o melhor momento para a beneficiação, existem alguns sinais clínicos que ajudam a sua identificação. Nestes sinais clínicos estão incluídos a redução do edema vulvar e a alteração do corrimento vulvar. Ainda assim, a observação dos sinais clínicos tem sempre alguma subjetividade.

A redução da tensão do edema vulvar é um indicador da aproximação do melhor momento para a beneficiação. O edema vulvar é mais marcado no proestro, e está associado ao aumento dos níveis de estrogénio. Na transição do proestro para o estro, aquando do pico de LH, ocorre redução do edema vulvar. De facto, este sinal clínico é bastante subjetivo, tornando a determinação do momento de beneficiação mais falível. Para além disto, a grande variabilidade individual também é um fator a ter em conta para evitar uma beneficiação no momento errado, uma vez que há cadelas em que as mudanças da turgidez vulvar não são tão evidentes (Narita *et al.*, 2000). Relativamente ao corrimento vulvar, este sofre alterações tanto na consistência como na coloração e na sua abundância ao longo do ciclo éstrico. No proestro, o corrimento é, frequentemente, sero-sanguinolento e bastante abundante, mas com a aproximação do estro o corrimento vai perdendo, gradualmente, a cor avermelhada, tornando-se menos abundante e mais claro (Martins *et al.*, 2007).

No que respeita ao comportamento sexual, a cadela em proestro atrai os machos, mas não aceita a monta, o que só acontece ao entrar no estro. Estudos realizados em cadelas, em ambiente de laboratório, demonstraram que a aceitação do macho ocorre cerca de dois dias antes da ovulação, pelo que o período ótimo para a beneficiação seria três a quatro dias após o início da aceitação da monta (England & Heimendahl, 2010). Todavia, existe uma fraca correlação entre o comportamento sexual e as alterações endócrinas, em cadelas, tornando este critério bastante falível. De facto, o comportamento sexual pode ser bastante evidente, mas também pode ser quase impercetível ou mesmo intermitente e induzir o tutor em erro. Para além disto, é necessário ter em atenção que algumas cadelas

podem ser recetivas a determinados machos em detrimento de outros, muitas vezes decorrente da hierarquia social (Hurnik, 1987).

Considerando que os sinais clínicos de cio são pouco sensíveis para identificar o momento de maior fertilidade da fêmea e do momento adequado à beneficiação, a abordagem a cada cadela deve ser direcionada e deve ter em conta outros critérios mais objetivos como a medição de hormonas circulantes (England & Heimendahl, 2010).

### **3.2 Concentrações hormonais**

O doseamento de hormonas, como a progesterona e LH, permite determinar com maior precisão o dia da ovulação. Existem várias técnicas para a determinação hormonal, como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), CLIA (Chemiluminescent Immunoassay), RIA (Radioimmunoassay), e ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), para além de alguns kits semiquantitativos de medição das concentrações circulantes de hormonas, de deteção rápida em consultório.

Os imunoensaios, como CLIA, ELFA e RIA, são dos mais usados para determinar a concentração de progesterona. Estes imunoensaios usam anticorpos direcionados contra um antigénio específico - a progesterona. No entanto, cada um destes ensaios difere no método de deteção. Os radioimunoensaios (RIA) medem a radiação gama que é emitida pelo iodeto radioativo ( $^{125}\text{I}$ ) ou trítio ( $^3\text{H}$ ) que estão associados ao anticorpo. Apesar do RIA ter sido o método recomendado por muitos anos, não está disponível para uso em clínicas ou hospitais, uma vez que utiliza materiais radioativos. Por outro lado, existem técnicas não radioativas como o CLIA e o ELFA. Em cada ensaio, a progesterona na amostra compete com a progesterona marcada com uma enzima, para se ligar aos anticorpos fixados na parede do poço. Isto resulta numa leitura em que a quantidade de progesterona na amostra é inversamente proporcional à intensidade da luminescência (CLIA) ou à fluorescência (ELFA) produzida (Hisanaga, 2021).

De acordo com um estudo realizado por Gloria *et al.* (2018), a técnica utilizada para avaliar a concentração de progesterona influencia os valores obtidos na mensuração. Como a decisão do melhor momento para beneficiar a cadela é tomada tendo em conta os valores de progesterona obtidos, torna-se importante ter em consideração a técnica utilizada, para tomar uma melhor decisão.

### 3.2.1 Determinação dos valores de LH

O pico de LH determina a ovulação. Este pico é estimulado pelo decréscimo dos níveis circulantes de estrogénios que se observa no final do proestro. O pico de LH, na ordem dos 7 a 50 ng/mL, mantém-se por 24 a 40 horas, antes de diminuir para valores basais (Martins *et al.*, 2007).

Para a determinação dos níveis circulantes de LH, o WITNESS® LH é um teste rápido que proporciona uma medição semiquantitativa da LH (Figura 4). Este teste é um ensaio imunocromatográfico que utiliza anticorpos conjugados com ouro, formando uma linha visível na presença da LH. Este teste, perante um resultado positivo, apenas indica que os níveis de LH são superiores a 1ng/mL (Zoetis, 2007).



Figura 4. Teste rápido de deteção de LH (Witness®), (Zoetis, 2024)

Teoricamente, o doseamento de LH seria o método ideal. No entanto, para determinar o pico de LH é necessário fazer venopunção na cadela pelo menos duas vezes ao dia e, para além disso, em muitos países, incluindo em Portugal, é difícil de se encontrarem disponíveis os testes rápidos. Desta forma, a deteção dos níveis de LH só é possível através de testes de laboratório como RIA, o que torna o processo mais moroso e dispendioso para os criadores (Levy & Fontbonne, 2007).

### 3.2.2 Determinação dos valores de Progesterona

A determinação dos níveis circulantes de progesterona é o método mais utilizado para determinar o dia da ovulação, uma vez que o pico de LH está associado ao aumento dos níveis de progesterona (Gloria *et al.*, 2018).

A fonte primária de progesterona são os corpos lúteos dos ovários, e por isso se considera que concentrações elevadas de progesterona podem indicar, qualitativamente, a presença do tecido lúteo ativo. Para otimizar o manejo da beneficiação, a medição da

progesterona pode ser utilizada, em combinação com outros métodos (Hussein *et al.*, 2022), para identificar o período fértil na cadela.

Na cadela, há uma significativa luteinização pré-ovulatória dos folículos na fase final do seu desenvolvimento, durante e após o pico de LH, o que promove um aumento progressivo e rápido dos níveis de progesterona. De facto, a monitorização seriada dos valores de progesterona permite identificar o dia da ovulação e, também, o período de fecundação. Como o aumento inicial de progesterona é progressivo, só é necessário colher sangue a cada dois ou três dias, no caso do uso de testes quantitativos. No entanto, quanto menor a frequência das análises, menor a precisão na identificação do dia da ovulação (England & Concannon, 2002).

A progesterona, tal como a LH, pode ser determinada recorrendo a métodos quantitativos ou semiquantitativos. Os métodos quantitativos são mais precisos, permitindo um seguimento mais rigoroso do ciclo éstrico, mas são, simultaneamente, mais dispendiosos e em alguns casos mais morosos. Como mencionado anteriormente, os métodos CLIA, RIA e ELFA são quantitativos. Em relação aos testes semiquantitativos, estes permitem a obtenção do resultado em poucos minutos, no entanto também são menos precisos. Neste momento, existem vários testes rápidos de determinação de progesterona (semiquantitativos) no mercado, que se baseiam na comparação da cor obtida na reação com uma escala de correspondência entre a cor e os valores de progesterona. Desta forma, estes testes apenas permitem estimar os níveis de progesterona, pela subjetividade na comparação de cores com a escala fornecida. Nas cadelas, a rápida disponibilidade dos resultados da progesterona é de particular importância, uma vez que na fase periovulatória, o aumento das concentrações de progesterona é bastante acelerado (Hussein *et al.*, 2022). Atualmente, estes testes são pouco utilizados na prática clínica, existindo várias opções no mercado para a determinação mais precisa dos valores circulantes de progesterona.

Os equipamentos analíticos que permitem a determinação quantitativa rápida de hormonas em consultório apresentam, no entanto, alguma variabilidade nos resultados, pelo que deveriam ser calibrados por contrastação com um equipamento mais preciso, como os usados para investigação, e determinar se o equipamento usado está a subestimar ou sobrestimar a progesterona circulante. Na Figura 5 mostra-se a diferença entre dois equipamentos (International Canine Semen Bank, 2024).

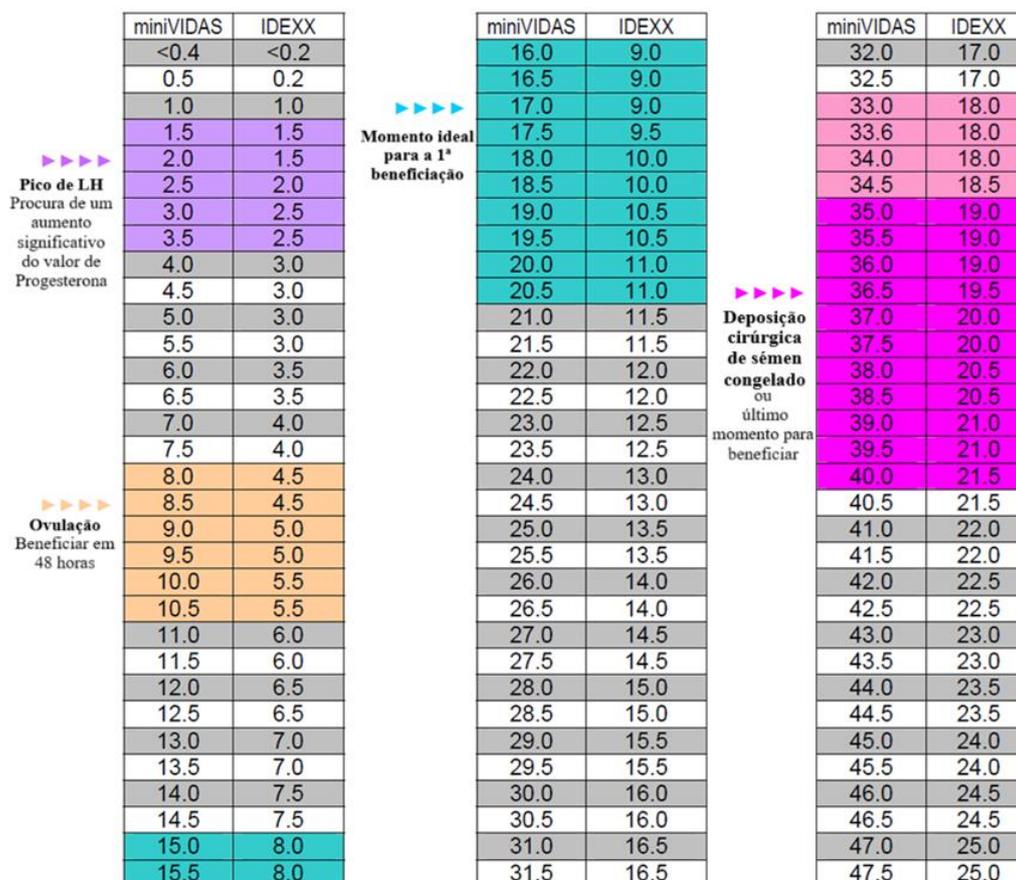


Figura 5. Valores comparativos de progesterona. Adaptado de (International Canine Semen Bank, 2024)

Na cadela, os níveis circulantes de progesterona vão variando ao longo do ciclo éstrico. Considerando-se como padrão os valores fornecidos pelo equipamento miniVIDAS®, durante o anestro e no proestro os níveis circulantes de progesterona são normalmente inferiores a 1 ng/mL. Dois dias antes da ovulação, no momento do pico de LH, os níveis de progesterona encontram-se entre 1,5 a 3,5 ng/mL. No dia da ovulação, a progesterona atinge valores na ordem dos 8,0 a 10,5 ng/mL (Figura 5). Após ser atingido este intervalo de valores, a cadela deve ser beneficiada nas 48 horas seguintes. De facto, a primeira beneficição deve ocorrer com valores num intervalo de 15,0 a 20,5 ng/mL e a segunda beneficição, caso seja realizada, cerca de dois dias depois. No caso de se utilizar sémen congelado, a beneficição deve ser realizada um pouco mais tarde, quando os valores de progesterona atingem os 35 a 40 ng/mL, ou seja, devendo ser a primeira IA realizada no quinto dia e a segunda no sexto dia, em relação ao dia do pico de LH. Uma

vez que o tempo de vida do sêmen descongelado é de apenas algumas horas, deve-se beneficiar apenas quando a maturação dos oócitos estiver completa. Com o avançar do ciclo, no diestro os valores de progesterona vão aumentando até atingir um plateau. No caso de a cadela ficar gestante, este plateau será mais prolongado, levando a um decréscimo mais lento até à altura do parto, em que ocorre uma diminuição rápida para valores inferiores a 2 ng/mL. Por outro lado, se a cadela não estiver gestante, após o plateau a diminuição será mais gradual até atingir valores inferiores a 1 ng/mL, cerca de 30 a 40 dias antes do início do proestro (P. W. Concannon, 2011).

### **3.3 Vaginoscopia e endoscopia vaginal**

A vaginoscopia envolve o uso de um instrumento para visualizar o aspeto caudal da vagina da cadela; é normalmente realizado com a cadela em estação e sem necessidade de sedação. Pode ser realizado com recurso a um vaginoscópio (vaginoscopia), ou a um endoscópio rígido com capacidade de fibra ótica (endoscopia vaginal) (Folnozic *et al.*, 2009). Este último permite a visualização da porção mais cranial da vagina (Lulich, 2006) e a observação do óstio cervical externo. Para a endoscopia vaginal é muitas vezes utilizado um proctoscópio pediátrico humano. Para além de permitir avaliar a existência de alterações congénitas ou adquiridas do espaço vaginal, a observação das alterações cíclicas da mucosa vaginal pode ainda dar alguma informação sobre a fase do ciclo éstrico. A mucosa vaginal sofre várias alterações tanto na cor, como na textura, ao longo das diferentes fases do ciclo éstrico (Figura 6). Numa fase inicial, as mudanças decorrem do aumento dos níveis de estrogénios; mas mais tarde são devidas ao aumento dos níveis de progesterona. Por isso se considera que, para estadiamento do cio, a vaginoscopia ou endoscopia vaginal dão uma informação equivalente à da citologia vaginal. Durante o anestro, a mucosa vaginal apresenta-se rosa e pouco pregueada. Esta cor rosa intensa deve-se à espessura da mucosa vaginal, uma vez que nesta fase é bastante fina permitindo uma maior proximidade dos capilares à superfície do epitélio da vagina. Avançando para o proestro, começam a aparecer várias pregas longitudinais, denominadas “pregas primárias”. Nesta fase, a mucosa vai progressivamente perdendo a intensidade da cor, tomando um tom rosa-pálido. Com o aproximar do fim do proestro, o edema torna-se cada vez mais evidente, a mucosa cada vez mais pálida, e desenvolvem-se pregas transversais, denominadas de “pregas secundárias”. No estro, com o aumento das

concentrações de progesterona e a diminuição do estrogénio, os efeitos vasodilatadores, causados pelo estrogénio, desaparecem. Para além disto, o edema acaba por resolver, deixando uma mucosa muito pálida e muito pregueada. Durante esta fase, a mucosa é muito sensível e responde ao toque do vaginoscópio, com hiperémia (Christensen, 2011). Por fim, no diestro, as pregas vaginais começam a achatarse, a mucosa aparenta-se avermelhada e, por vezes, é visível um muco espesso, na superfície do epitélio (Payan-Carreira *et al.*, 2011).

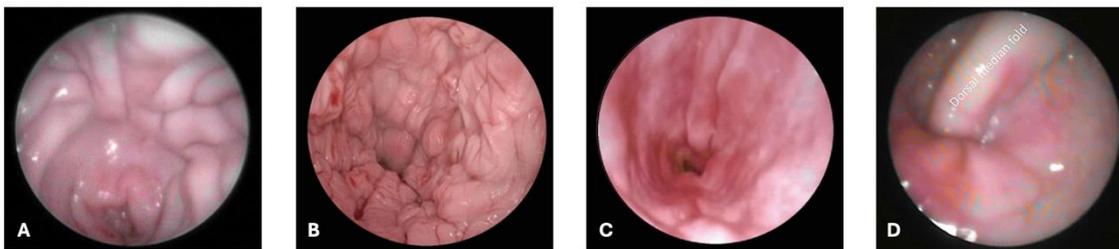


Figura 6. Vaginoscopia vaginal em cadela. A. no proestro; B- no estro; C- no diestro; D - no anestro. Adaptado de (Maenhoudt & Dos Santos, 2021)

Se se utilizarem estas duas técnicas para deteção do período fértil da cadela, a beneficiação (monta natural ou sémen fresco) deve ser planeada para cerca de 4 dias depois da deteção da redução do pregueamento da mucosa. Tendo em conta a subjetividade inerente a estas técnicas, a principal desvantagem desta prática reside no facto de exigir uma larga experiência na deteção das alterações da mucosa, sem a qual não se torna uma técnica. Por outro lado, se se pretender fazer a inseminação artificial da fêmea com sémen congelado, estas técnicas não têm sensibilidade suficiente para poderem ser utilizadas isoladamente (Martins *et al.*, 2007).

### 3.4 Citologia vaginal

A avaliação das células epiteliais para estadiamento do ciclo éstrico é um dos usos mais comuns da citologia vaginal na prática clínica veterinária. São várias as técnicas descritas para obtenção de células vaginais para avaliação citológica, usando-se para isso uma zaragatoa, que pode ser humedecida com soro fisiológico. Para a colheita das células, os lábios vulvares devem ser separados para facilitar a introdução da zaragatoa craniodorsalmente, na direção da coluna vertebral. É importante evitar o vestíbulo e a fossa do clitóris, que possuem células superficiais escamosas queratinizadas e podem

enviesar a interpretação da citologia vaginal. Assim que a zaragatoa está cranial ao orifício uretral, deve tentar progredir-se o mais cranialmente possível, para induzir a esfoliação das células vaginais pela rotação da zaragatoa sobre o epitélio. Quanto mais profunda for a colheita, melhor a qualidade de informação que se poderá obter. Posteriormente, na transposição para a lâmina, são realizadas três a quatro linhas rodando, gentilmente, a zaragatoa. De seguida, é realizada a fixação e coloração das lâminas (Raskin & Meyer, 2015).

A coloração dos esfregaços é uma etapa fundamental para permitir uma correta identificação dos diferentes tipos celulares. De facto, existem vários tipos de colorações disponíveis, no entanto, as mais utilizadas são as colorações derivadas do corante de Romanowsky, como o Diff Quick, May-Grunwald Giemsa ou Wright. Na Tabela 1, estão descritos, brevemente, os protocolos de cada uma destas colorações.

Tabela 1. Protocolos de diferentes tipos de colorações (Martins *et al.*, 2007)

<b>Método</b>	<b>Execução</b>
Diff-Quick®	Imergir 9 a 10 vezes em cada uma das três soluções, por esta ordem: Fixador (Metanol) → Solução eosinófila (Vermelho) → Solução basófila (Azul) Lavar em água corrente
May-Grunwald Giemsa	Cobrir todo o esfregaço com o corante May-Grunwald e deixar incubar durante 1 min. Remover o excesso e colocar solução tampão deixando repousar durante 1 min. Lavar e adicionar o corante Giemsa, deixando a incubar durante 10 min. Lavar com água corrente.
Wright	Cobrir todo o esfregaço com <i>n</i> ml de corante e deixar incubar durante 2 minutos. Adicionar <i>n</i> ml de água destilada, misturar com o corante (soprando com uma pêra de borracha) e deixar repousar durante 2 minutos. Lavar com água destilada ou com água corrente (se se pretender uma tonalidade mais azulada).

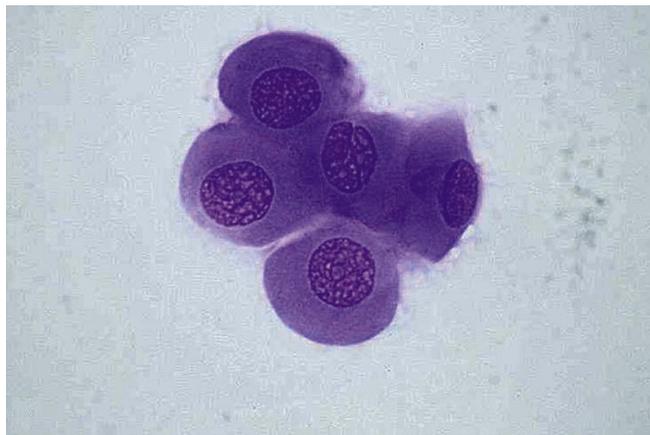
A associação da citologia vaginal a outros métodos, como a determinação dos níveis de progesterona circulante, permite aumentar a eficiência na deteção do período fértil, aumentando a precisão com que se estima a ocorrência da ovulação (Martins *et al.*, 2007).

### 3.4.1 Interpretação da citologia vaginal

A mucosa da vagina é constituída por um epitélio escamoso estratificado, que sofre alterações morfológicas características em resposta aos teores circulantes de esteróides sexuais (Raskin & Meyer, 2015). As células epiteliais descamadas que se observam em citologia vaginal podem ser classificadas em: células basais (que raramente são

observadas nas citologias vaginais; Valenciano & Cowell, 2020), parabasais (Figura 7), intermédias (Figura 9) e superficiais (ou queratinizadas) (Figura 8), incluindo as suas formas de transição. Para além das células epiteliais, em algumas situações podem ainda observar-se as designadas células espumosas (Figura 10), eritrócitos, neutrófilos, muco, bactérias e espermatozóides. Estes elementos adicionais podem servir para completar a informação das células epiteliais e são úteis na determinação da fase do ciclo, mas podem também ser úteis no diagnóstico de algumas doenças reprodutivas.

Derivado do aumento das concentrações de estrogénios circulantes, no proestro e estro, observa-se uma proliferação do epitélio vaginal e um aumento da espessura do epitélio (Marti, 2002). Em consequência, as células que mais frequentemente são observadas na citologia passam de células redondas pequenas (sobretudo células parabasais) para células redondas de maior tamanho, com um rácio núcleo citoplasma que vai diminuindo à medida que as concentrações de estrogénio aumentam.



*Figura 7. Cluster de células parabasais – que são as células epiteliais mais pequenas observadas na citologia vaginal; são redondas, com núcleos vesiculados redondos, citoplasma basofílico e um elevado rácio núcleo-citoplasma e, normalmente, são uniformes no tamanho e forma. (coloração Wright-Giemsa, ampliação 1000x) (Raskin & Meyer, 2015).*

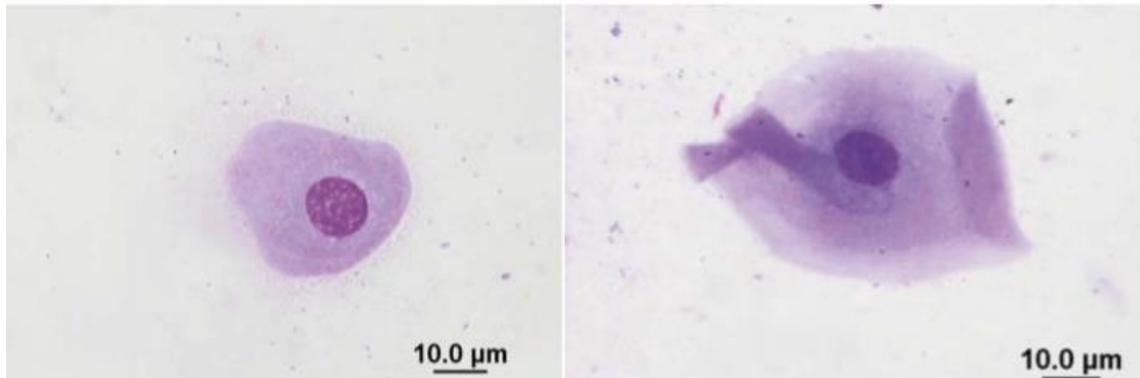


Figura 9. **Células intermediárias pequena** (à esquerda) e **grande** (à direita)- que são células maiores que as parabasais, com núcleos vesiculados, e à medida que aumentam de tamanho, o citoplasma torna-se irregular e angular, semelhante ao citoplasma das células superficiais; variam no tamanho, dependendo da quantidade de citoplasma presente. (coloração Wright, ampliação 1000x) (Valenciano & Cowell, 2020)

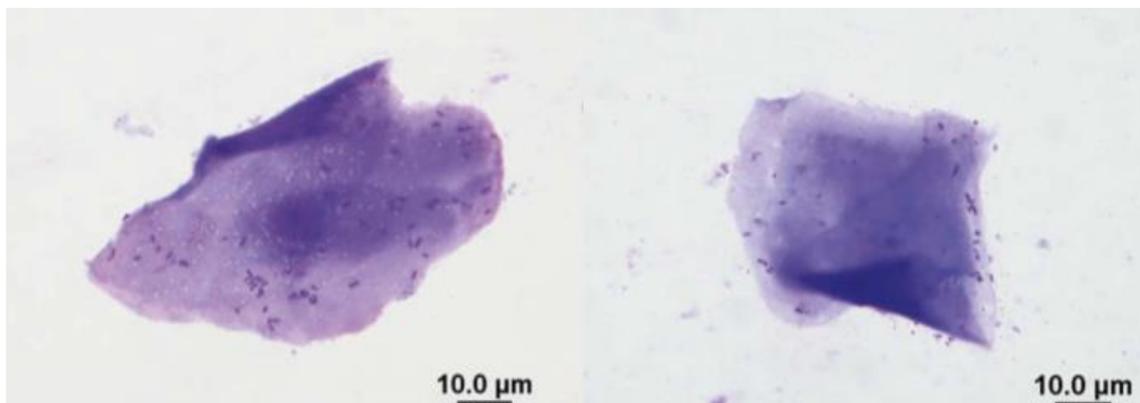


Figura 8. **Célula superficial** com núcleo picnótico (à esquerda) e **célula superficial anucleada** (à direita)- são as maiores células epiteliais, são células mortas, com núcleo picnótico que vão progredindo para células anucleadas, citoplasma abundante, angular e, muitas vezes, dobrado sobre si mesmo, podem desenvolver pequenos vacúolos (coloração Wright e ampliação 1000x) (Valenciano & Cowell, 2020)



Figura 10. **Célula espumosa** - são células parabasais ou intermediárias que contêm vacúolos citoplasmáticos e podem ser associadas com o diestro e o anestro. espumosa (coloração Diff- Quick, ampliação 1000x) (Martins et al., 2007)

A Figura 11 resume a relação entre os níveis de estrogénios circulantes e a variação na morfologia das células epiteliais, bem como mostra os tipos celulares mais abundantes em cada fase do ciclo.

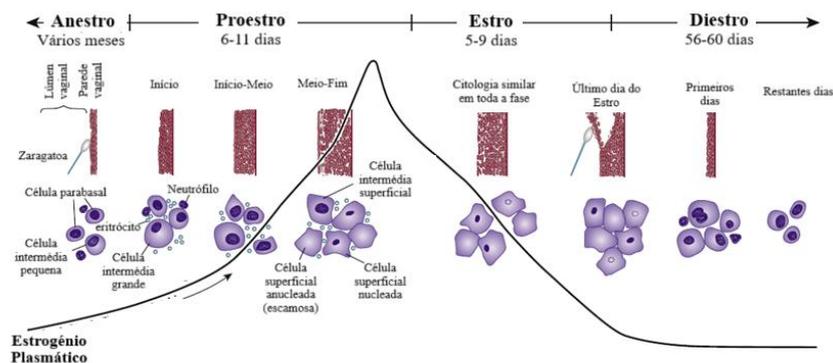


Figura 11. Relação entre as alterações na parede vaginal, citologia vaginal e as fases do ciclo estrico com os níveis de estrogénio. Adaptado de (Raskin & Meyer, 2015)

No **Proestro**, com o aumento das concentrações de estrogénios (estradiol) circulantes, decorrentes da maturação folicular, o epitélio vaginal prolifera. O ambiente estrogénico favorece a diapedese de eritrócitos provenientes do endométrio. Assim, as citologias realizadas no início e a meio do proestro caracterizam-se por uma mistura de células epiteliais, incluindo parabasais, intermédias pequenas e grandes e superficiais e, também, um número bastante variável de neutrófilos e eritrócitos. Nesta fase, o fundo do esfregaço pode apresentar-se com muco basofílico (Figura 12A). Com o avançar do proestro, a parede vaginal continua a espessar, contrariando a chegada dos neutrófilos ao lúmen vaginal, e, por conseguinte, o seu número diminui na citologia. Progressivamente, a percentagem de células intermédias grandes e de células superficiais vai aumentando, enquanto vai diminuindo a percentagem de células parabasais e células intermédias pequenas. No fim do proestro, quando os níveis de estrogénio decrescem, mais de 80% das células epiteliais são superficiais e os neutrófilos estão ausentes (Figura 12B). Em relação aos eritrócitos, estes podem estar presentes ou ausentes, consoante a cadela. Com frequência, as bactérias estão presentes em grande número (Valenciano & Cowell, 2020).

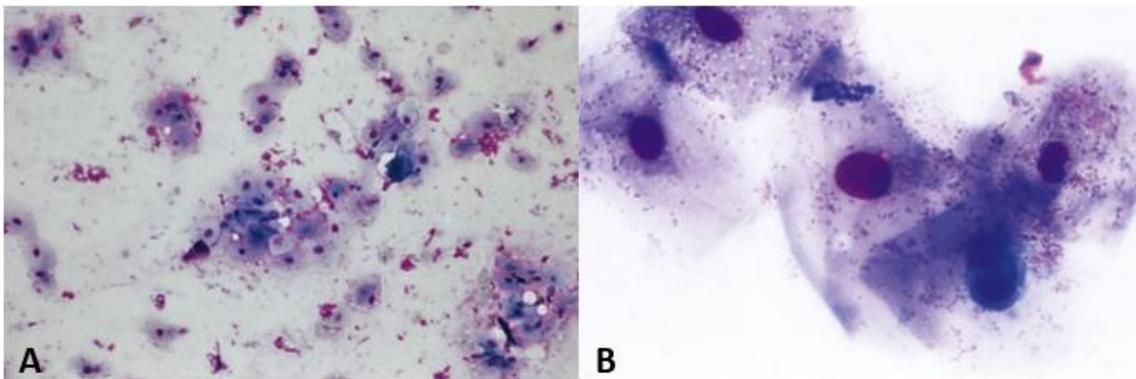
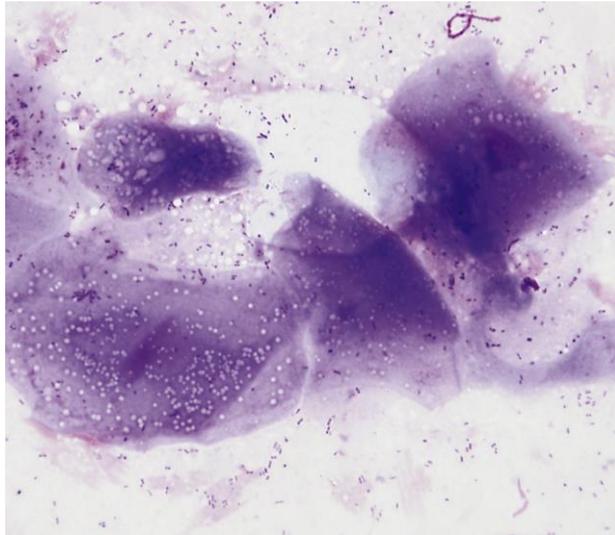


Figura 12. **Citologia vaginal em cadela.** **A -em proestro** observa-se a presença de células intermédias e poucas células superficiais; eritrócitos presentes; fundo basofílico devido à presença de muco (coloração Wright-Giemsa, ampliação 400x). **B- em fim de proestro:** Células intermédias e superficiais com núcleo picnótico e citoplasma moderadamente basofílico com bordos angulares; células associadas a elevados números de bactérias). (coloração Wright-Giemsa, ampliação 1000x). Adaptado de (Raskin & Meyer, 2015)

No **Estro**, mais de 80 a 90% das células epiteliais exfoliadas são células superficiais. Tipicamente, a maioria destas células possuem um pequeno núcleo picnótico, mas podem também apresentar-se como células anucleadas. A queratinização é máxima no fim do proestro e durante todo o estro. Uma vez que a máxima queratinização pode ocorrer tão cedo como no sexto dia antes do pico de LH, ou tão tarde como o terceiro dia após o pico de LH, a citologia vaginal é um mau preditor da ovulação. Os esfregaços realizados durante o estro têm normalmente um fundo límpido e livre de muco e podem, ou não, conter eritrócitos (Figura 13). É também frequente observar-se grande número de bactérias aderidas às células superficiais e em torno destas. No entanto, os neutrófilos costumam estar ausentes, a menos que haja inflamação (Valenciano & Cowell, 2020).



*Figura 13. Citologia vaginal no estro: predominância de células superficiais; nesta imagem pode observar-se a presença de muitas bactérias (coloração Wright, ampliação 1000x). (Valenciano & Cowell, 2020)*

No **Diestro**, acompanhando o acréscimo da progesterona circulante e o decréscimo dos estrogénios, observa-se uma mudança brusca do número de células epiteliais superficiais. Durante um período de 24 a 48 horas, este número diminui para cerca de 20%, enquanto as células parabasais e intermédias aumentam de número. Nesta fase, os neutrófilos voltam a aparecer na citologia, em número variável, e os eritrócitos e bactérias podem ou não estar presentes no esfregaço (Figura 14). Na fase inicial do diestro podem observar-se as chamadas células metaéstricas. Estas são células epiteliais, geralmente intermédias grandes, que apresentam um neutrófilo aderido ao citoplasma (Figura 14B).

Os esfregaços realizados no período de transição do fim do estro para o início do diestro, podem ser muito semelhantes aos esfregaços realizados no meio do proestro. Desta forma, é importante associar a citologia com outros métodos com os níveis sanguíneos de progesterona. Quando em dúvida, repetir a citologia em três a quatro dias (Valenciano & Cowell, 2020).

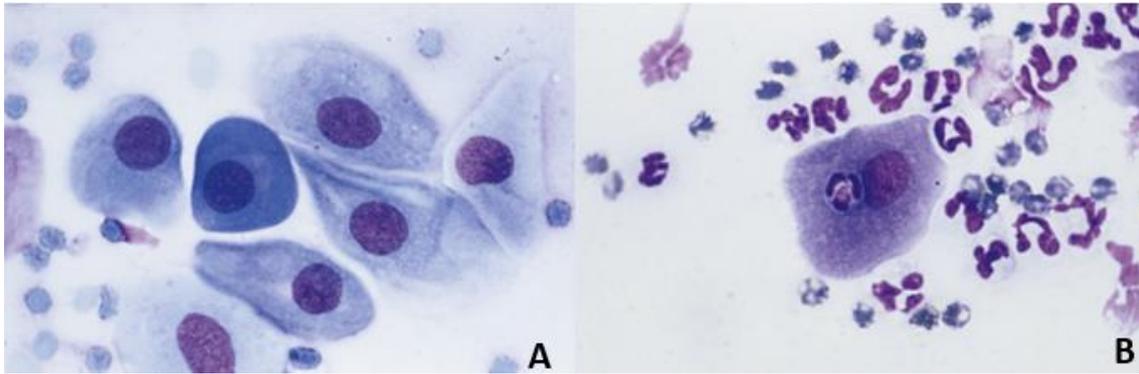


Figura 14. **Citologia vaginal de cadela em diestro.** A: células intermédias e parabasais e alguns eritrócitos presentes. B: elevado número de neutrófilos e eritrócitos e a presença de uma célula metaéstrica, ao centro. (coloração Wright, ampliação 1000x). Adaptado de (Raskin & Meyer, 2015).

Em **Anestro**, predominam na citologia as células parabasais e intermédias (Figura 15). Os neutrófilos e as bactérias, se presentes, estão em baixo número. Em alguns animais é ainda possível observar-se a presença de muco, em quantidade variável (Valenciano & Cowell, 2020).

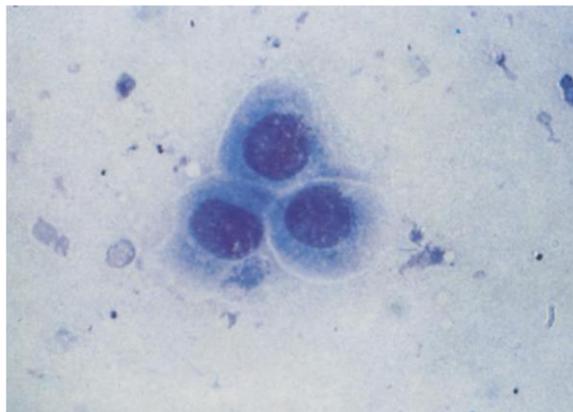


Figura 15. **Citologia vaginal de cadela em anestro:** presença de células parabasais. (coloração Wright, ampliação 400x). (Valenciano & Cowell, 2020)

#### 4. Gestação

Nas cadelas, a única fonte de progesterona durante a gestação é ovárica (CL) e a sua produção requer tanto LH como prolactina. Na primeira metade do diestro, a LH é o principal fator luteotrópico na cadela, sendo este papel desempenhado pela prolactina na segunda metade do diestro. A concentração de prolactina aumenta por volta dos 30 dias e mantém-se elevada durante a gestação e a lactação.

A partir do dia 21 a 24 após o pico de LH e até ao fim da gestação os níveis de relaxina estão elevados, chegando a atingir concentrações de 5ng/mL. Apesar de ser a única proteína específica da gestação identificada nas cadelas, o seu papel ainda não está bem esclarecido, mas pensa-se que pode ter uma influência na promoção da secreção de progesterona pelas células lúteas, em cadelas gestantes (Verstegen-Onclin & Verstegen, 2008).

#### **4.1 Diagnóstico de gestação**

Existem vários métodos de diagnóstico de gestação em cães, que devem ser utilizados tendo em conta o tempo de gestação. São quatro os principais métodos de diagnóstico: palpação abdominal, ecografia abdominal, medição da relaxina sérica e radiografia. Em relação à palpação abdominal, este é um método que dá muito pouca informação, uma vez que apenas é possível palpar um útero aumentado de tamanho, presumivelmente gestante (Davidson, 2014). A ecografia é o método mais fiável, que permite não só detetar a gestação, mas também determinar a viabilidade dos fetos. Efetivamente, a partir do dia 25 é possível a deteção do batimento cardíaco fetal e acompanhar o seu desenvolvimento morfológico; no entanto, a ecografia não é um bom método para estimar o tamanho da ninhada.

A relaxina, que é uma hormona produzida pela placenta, atinge níveis detetáveis, por volta do dia 25 de gestação. Apesar de ser uma hormona específica da gestação, podem ocorrer falsos negativos, numa fase mais inicial da gestação, e por isso a cadela deve ser testada de novo cinco a seis dias mais tarde, ou falsos positivos se a cadela perdeu a gestação (England *et al.*, 2010). Para além da relaxina, existem mais hormonas que têm um papel fundamental na gestação, nomeadamente a progesterona. No entanto, é de notar que, como a cadela apresenta níveis de progesterona, na circulação periférica, muito semelhantes, quer esteja gestante ou não gestante, esta hormona não pode ser usada para diagnosticar a gestação como acontece noutras espécies (Noakes, 2001).

Por fim, a radiografia apenas permite um diagnóstico positivo de gestação quando já há calcificação fetal, o que ocorre a partir do dia 42. Na verdade, a radiografia é o método mais eficaz para determinar o número de fetos e a sua posição (England *et al.*, 2010).

## **4.2 Previsão da data de parto**

A duração da gestação da cadela pode ser afetada por vários fatores, nomeadamente a raça e o tamanho da ninhada, sendo que para ninhadas pequenas a gestação tende a ser mais longa e para ninhadas grandes tende a ser mais curta. A previsão da data de parto permite uma melhor monitorização da gestação e um melhor maneio do parto e ajuda a diminuir a perda de neonatos, especialmente nos casos em que está planeada uma cesariana eletiva (Arlt, 2020). Para estimar a data do parto na cadela estão disponíveis vários métodos, que podem ser utilizados em associação. Quando é feito o planeamento da beneficiação da cadela, através da determinação dos valores de progesterona, é possível estimar a data do pico de LH e a data da ovulação. De facto, com as datas do pico de LH e da ovulação é possível prever a data do parto. Para além disso, existem outros métodos para a previsão da data de parto, como o início do diestro citológico, ecografia e radiografia.

### **4.2.1 Data das beneficiações**

O tempo de gestação tendo como base a data das beneficiações não é um método preciso para determinar o dia do parto. Efetivamente, o tempo de gestação pode variar entre 56 e 72 dias, porque a duração do período fértil é bastante variável e os espermatozóides têm uma grande viabilidade no trato reprodutivo da cadela (até 9 dias) (P. Concannon *et al.*, 1983).

### **4.2.2 Alterações hormonais e citologia vaginal**

A medição dos níveis de progesterona é um parâmetro essencial para a deteção do pico de LH, da ovulação e da data do parto. Tendo em conta a variabilidade da duração da gestação, o tempo estimado de gestação encontra-se entre os 56 e os 72 dias. A duração da gestação torna-se muito mais previsível quando calculado em relação ao dia do pico pré-ovulatório de LH, ao dia da ovulação ou ainda ao primeiro dia de diestro citológico. Efetivamente, quando calculado em relação ao pico pré-ovulatório de LH, a duração da gestação tem uma média de  $65,1 \pm 0,1$  dias e, quando em relação ao dia estimado da ovulação tem uma média de 63 dias (Arlt, 2020). Em relação ao dia do início do diestro citológico, a gestação tem uma duração média de  $57 \pm 1$  dias (Riquelme & Ruiz, 2017).

Estes são métodos bastante precisos para determinar o dia do parto (P. Concannon *et al.*, 1983).

A citologia vaginal é útil para detetar o primeiro dia do diestro. De facto, é bastante fácil proceder à identificação do primeiro dia do diestro, uma vez que a percentagem de células queratinizadas sofre uma alteração brusca de 80-100% para menos de 20% e há o aparecimento de células parabasais. O primeiro dia do diestro é definido como o primeiro dia em que se torna evidente esta alteração brusca. Quando a duração da gestação é calculada a partir do primeiro dia do diestro há uma variação de  $57 \pm 3$  dias (Siena & Milani, 2021).

#### **4.2.3 Ecografia e Radiografia**

A determinação do tempo de gestação pode ser baseada na avaliação ecográfica ou radiográfica, através da avaliação das estruturas embrionárias e fetais. As radiografias permitem determinar o tamanho da ninhada com uma precisão de 93% e proporcionam uma estimativa aproximada da idade gestacional através da avaliação da visibilidade de certos ossos e dos dentes (Arlt, 2020). Através da ecografia é possível realizar medições fetais e extra-fetais, o que permite estimar a idade gestacional e consequentemente o dia estimado do parto. Os dados obtidos através destas medições são utilizados em fórmulas e tabelas para a determinação da idade gestacional e dia do parto (Siena & Milani, 2021).

## **5. Objetivos**

Este trabalho, desenvolvido no âmbito do estágio curricular que decorreu entre 11 de setembro de 2023 e 11 de fevereiro de 2024, pretende avaliar a utilidade das medições dos níveis de progesterona no sangue e do uso de citologias vaginais para delimitar o período fértil das cadelas e estimar a data do parto. Para esse efeito foram acompanhadas várias cadelas (n=11), desde o momento em que os tutores identificaram sinais clínicos de “cio”, até ao parto.

Para cumprir os objetivos propostos realizaram-se as seguintes abordagens:

- Estadiamento da fase de cio com recurso à citologia vaginal e determinação dos níveis de progesterona no sangue;
- Delimitação do período fértil da cadela e determinação do momento de beneficiação;
- Avaliar o sucesso da beneficiação (por inseminação artificial ou monta natural) através de diagnóstico ecográfico de gestação;
- Estimar a data do parto com base na determinação do dia do pico de LH e do dia da ovulação
- Avaliar a relação entre o tamanho da ninhada e a duração da gestação;
- Influência do método de beneficiação sobre o tamanho da ninhada.

## **6. Material e métodos**

Neste estudo foi utilizada uma amostra intencional constituída por 11 cadelas em idade reprodutiva; cada animal foi identificado por uma letra de A a K. As cadelas apresentaram-se no HVSM durante o período de estágio para seguimento do cio, beneficiação e acompanhamento da gestação; no caso de algumas cadelas estava também prevista a realização de cesariana eletiva. Para todos os animais incluídos no estudo obteve-se a permissão dos tutores para recolha e utilização das amostras para elaboração deste trabalho, sob tutoria clínica da Dr<sup>a</sup> Diana Meireles.

Para cada animal foram recolhidos os principais dados demográficos (idade e raça), os valores da determinação de progesterona circulante, os resultados da avaliação das citologias vaginais realizadas, o tipo de beneficiação [monta natural vs. Inseminação artificial (IA) com sémen fresco, refrigerado ou congelado), a data do parto e o tamanho da ninhada.

As cadelas eram apresentadas à consulta para confirmar se se encontravam no período fértil, uma vez que já tinham detetado a presença de sinais clínicos compatíveis com a fase de cio, nomeadamente corrimento vaginal sanguinolento. Em todas as visitas feitas pelas cadelas, foi realizada uma citologia vaginal e colheita de sangue para doseamento de progesterona com o objetivo de delimitar o período fértil e identificar o

momento adequado à beneficiação. Na primeira consulta era realizado um exame clínico completo.

## **6.1 Recolha de amostras**

A prática instituída no HVSM inclui a realização de uma citologia vaginal para identificar a fase de cio em que a cadela se encontra no primeiro dia em que é apresentada à consulta, à qual poderá ser associada a determinação dos níveis de progesterona no sangue. Com estes resultados as consultas ou procedimentos seguintes eram adaptados a cada situação específica:

- Cadelas com resultados compatíveis com a fase de ovulação (valores de progesterona entre 8,0 e 12,0 ng/mL), - recomenda-se fazer a primeira beneficiação dois dias depois.

- Cadelas com resultados sugestivos da fase do pico de LH (aumento inicial dos valores de progesterona: >1,5- 3,5 ng/mL) – sugere-se reavaliação da situação a cada dois dias, até à data estimada de ovulação, e fazer a primeira beneficiação em dois dias.

Para cadelas com valores intermédios são agendadas consultas subsequentes para monitorização dos valores de progesterona, a intervalos definidos pelas evidências recolhidas na primeira consulta.

No entanto, o procedimento seguido é sempre condicionado pelas condições financeiras e a disponibilidade dos criadores. Por isso, encontraram-se criadores que têm por hábito trazer as cadelas em momentos mais próximos do que pensam ser o período de ovulação, para confirmação, em contraste com criadores que preferiam fazer a avaliação diariamente, até ao dia da primeira beneficiação.

### **6.1.1 Doseamento sérico da progesterona**

As amostras de sangue para doseamento de progesterona (1 mL) eram colhidas na veia jugular externa ou safena, em tubo seco, sendo posteriormente centrifugadas para obtenção do soro. A determinação de progesterona era realizada no HVSM, com recurso ao equipamento miniVidas® (BioMerieux), tendo em conta as instruções do fabricante.

O analisador miniVIDAS® é um equipamento multiparamétrico de imunoenensaio que realiza a determinação de diversas hormonas através da técnica ELFA, um teste imunoenzimático por fluorescência; no caso específico da progesterona, o equipamento permite a mensuração de concentrações circulantes de progesterona entre 0,25 e 80 ng/mL, e tem um tempo de ensaio de 45 minutos aproximadamente para um lote de 12 amostras (Hussein *et al.*, 2022).

### **6.1.2 Citologia Vaginal**

Para realização das citologias vaginais, introduzia-se uma zaragatoa humedecida através da vulva e vestíbulo vaginal, progredindo até ao fundo de saco vaginal. Depois de rodar algumas vezes, a zaragatoa era retirada e posteriormente rodada sobre uma lâmina de vidro, para obter o espécimen vaginal. Depois de secas ao ar, as lâminas eram coradas com *Diff-Quick*. A análise da citologia era realizada com base nas alterações quantitativas e qualitativas da população celular do epitélio vaginal (células basais/parabasais, células intermédias, células superficiais queratinizadas) e da presença eventual de outros elementos celulares, como neutrófilos, e eritrócitos.

O início do proestro citológico apresenta-se com uma mistura de células parabasais e intermédias e escassas células superficiais, escassos neutrófilos e presença de eritrócitos em número variável. O fim do proestro caracteriza-se por uma mistura de células superficiais (<80%) e células intermédias; ausência de neutrófilos e raros eritrócitos, além da presença de bactérias. O estro citológico foi definido como a presença de mais de 80% de células superficiais e menos de 5% de células parabasais e intermédias; os restantes 15% representam outros tipos celulares, como eritrócitos, neutrófilos e bactérias. O diestro citológico caracteriza-se pela diminuição abrupta em células superficiais e aumento das células intermédias pequenas. O anestro citológico é diagnosticado pela presença de poucas células, sendo, maioritariamente, células parabasais e intermédias (Raskin & Meyer, 2015).

### **6.1.3 Identificação do período fértil**

O período fértil é o tempo durante o qual a monta ou inseminação podem resultar em gestação, que inicia três dias antes do pico de LH até ao dia seis a oito após o pico de LH

(England & Concannon, 2002). No entanto, uma vez que a amplitude do período fértil é também influenciada pela viabilidade do espermatozoide no trato genital feminino, este período tem uma amplitude diferente consoante ao tipo de sémen usado (Tabela 2) (England & Concannon, 2002).

*Tabela 2. Períodos de maior fertilidade, para os diferentes tipos de beneficiação, desde o pico de LH (adaptado de England & Concannon, 2002)*

Período	Dias desde o pico de LH
Período de fertilidade potencial	-3 a +7 (ou mais tarde)
Período de pico de fertilidade para monta natural e para inseminação artificial com sémen fresco	0 a +6
Período para inseminação artificial com sémen refrigerado	+2 a +6
Período para inseminação artificial com sémen congelado	+4 a +6

Recorrendo-se à associação dos dados relativos à medição dos níveis de progesterona no sangue e a avaliação da citologia vaginal, foram estimados para cada cadela os dias do pico pré-ovulatório de LH e o dia de ovulação, de acordo com os seguintes critérios:

- Dia do pico de LH – dia em que os valores de progesterona sofreram um aumento inicial (>1,5- 3,5 ng/mL)
- Dia da ovulação – dia em que os valores de progesterona se encontravam entre 8,0 e 12 ng/mL

Valores de progesterona entre os 35,0 e os 40,0 ng/mL foram utilizados como referência como o último momento para realizar uma beneficiação.

#### **6.1.4 Beneficiação**

Neste estudo, apenas uma cadela foi beneficiada por monta natural; a cadela foi acompanhada no HVSM para determinar o melhor momento para se realizar a beneficiação. A monta foi realizada em casa e foi monitorizada pelo tutor, tendo sido realizados dois cruzamentos com dois dias de intervalo.

Oito cadelas foram beneficiadas por IA com sémen fresco. A recolha do sémen, realizada em contexto hospitalar, foi realizada por massagem manual no macho selecionado pelo criador. Na colheita de sémen por manipulação manual, realiza-se

massagem do pênis, retraindo o prepúcio caudalmente ao bulbo peniano antes do pênis ficar ereto, para simular os eventos que ocorrem na monta natural. A recolha de sémen processava-se na presença de cadela em cio.

O sémen era recolhido com recurso a um funil com tubo de plástico graduado acoplado, para possibilitar a medição do volume de sémen obtido. Uma vez que o macho ejacula em três frações, sendo a primeira e a terceira frações prostáticas enquanto a segunda fração é rica em espermatozoides (Freshman, 2002), é recomendado fazer a colheita destas frações em separado. Depois da recolha de sémen, este era avaliado macroscópica (volume, cor, textura, cheiro) e microscopicamente (motilidade). Após a verificação da qualidade do sémen (motilidade do sémen fresco e refrigerado de pelo menos 70%) e se considerado adequado era realizada a inseminação artificial da cadela. Apenas numa cadela (Cadela B) foi realizada uma única beneficiação, sendo as restantes cadelas submetidas a duas inseminações com dois dias de intervalo. Neste estudo, para cada inseminação vaginal foi utilizada a totalidade do ejaculado recolhido.

Apenas uma cadela (Cadela A) foi inseminada com sémen refrigerado, tendo o envio das doses seminais sido organizado pelo criador. A inseminação foi realizada com dois dias de intervalo, 4 a 6 dias depois do dia do pico de LH, também por via vaginal.

### **6.1.5 Diagnóstico de gestação e estimação da data de parto**

O diagnóstico da gestação foi realizado através de ecografia, sendo que a primeira ecografia calendarizada para a terceira ou quarta semanas após a primeira beneficiação; uma segunda ecografia era agendada para a sexta a sétima semanas de gestação. Na primeira ecografia, eram critérios para diagnóstico positivo a observação de vesículas embrionárias e existência de batimento cardíaco fetal (Siena & Milani, 2021).

Para este trabalho, a data do parto foi estimada utilizando como referência o dia estimado da ovulação, ao qual foram adicionados 63 dias. A confirmação da aproximação da data do parto foi feita, no decorrer da última semana de gestação esperada (nos últimos dois a três dias de gestação), através de ecografias.

## **6.2 Análise estatística**

Os dados foram organizados no programa informático Excel®, também utilizado como suporte de construção de gráficos e tabelas. A análise estatística foi realizada com recurso ao programa IBM SPSS Statistic 29 ®. Em relação aos testes estatísticos utilizados, para a determinação da normalidade da distribuição dos dados, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, uma vez que a amostra em estudo é pequena (Anexo I). Deste modo, apenas as variáveis duração da gestação e tamanho da ninhada possuem uma distribuição normal .

Para o estudo da relação entre duas variáveis quantitativas (tamanho da ninhada e duração da gestação) foi realizado o teste de correlação de Pearson. Para o estudo da relação entre uma variável quantitativa e uma variável qualitativa (tamanho da ninhada e tipo de beneficiação, respetivamente), foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A amostra (n) não é igual em todos os parâmetros avaliados, pelo que está devidamente identificada em cada estudo realizado.

## **7. Resultados**

### **7.1 Raça e idade**

Neste estudo utilizou-se uma população de conveniência constituída por 11 cadelas, de 8 raças diferentes, observadas entre 14 de outubro e 20 de fevereiro no HVSM. Duas cadelas eram Bulldog Francês, três Cocker Spaniel Inglês, e apenas uma fêmea representava cada uma das raças seguintes: American Bully, uma Parson Russel, uma Bulldog Inglês, uma Dogue Alemão, uma Schnauzer miniatura e uma Labrador Retriever. Destas raças em estudo, três delas são braquicéfalas (Bulldog Inglês, Bulldog Francês e American Bully). As cadelas apresentaram idades compreendidas entre 1 ano e 2 meses e 5 anos e 8 meses, com uma média de idades de  $3,0 \pm 1,6$  anos (Tabela 3).

Tabela 3. Raça e idade das cadelas incluídas no estudo

	Raça	Idade
A	Bulldog Francês	1 ano e 2 meses
B	Cocker Spaniel Inglês	1 ano e 10 meses
C	Bulldog Inglês	3 anos e 2 meses
D	Parson Russel	5 anos e 8 meses
E	Bulldog Francês	1 ano e 6 meses
F	Cocker Spaniel Inglês	4 anos e 2 meses
G	Dogue Alemão	2 anos e 3 meses
H	Schnauzer miniatura	5 anos e 7 meses
I	Cocker Spaniel Inglês	1 ano e 8 meses
J	Labrador Retriever	4 anos e 7 meses
K	American Bully	1 ano e 6 meses

## 7.2 Relação entre os valores de progesterona e a citologia vaginal

Os resultados das determinações de progesterona circulante e os resultados das citologias estão representados na Tabela 4.

Das 11 cadelas, duas apresentaram-se com valores de progesterona à primeira medição demasiado elevados (cadelas B e K), o que não permitiu estimar nem o dia do pico de LH nem o dia de ovulação. A cadela B apresentou-se com um valor muito perto do limite estabelecido para a última beneficiação (40,30 ng/mL), pelo que apenas lhe foi realizada uma inseminação. A cadela K apresentava um valor de 73,57 ng/mL, compatível com diestro, pelo que não foi beneficiada.

Para as cadelas A, D, F, G foi considerado que se encontravam na fase de ovulação no momento da primeira consulta. No caso das cadelas E, H e I, os valores de progesterona estavam abaixo dos indicativos do pico de LH, e por isso foram monitorizadas pelo tempo necessário para identificar os dias do pico de LH e de ovulação. A cadela J tinha ultrapassado o dia do pico de LH, e foi monitorizada para a deteção do dia da ovulação.

Das 11 cadelas, apenas duas se encontram fora do período de “cio”. Tanto a cadela B como a cadela K se encontravam fora do período fértil ou no seu limite.

De um modo geral, os resultados das citologias vaginais são compatíveis com os valores de progesterona. No entanto, é importante salientar que os resultados das citologias vaginais são mais suscetíveis a erros, uma vez que se trata de uma avaliação mais subjetiva.

Tabela 4. Resultados dos valores da progesterona e respetiva diagnóstico citológico

Cadela	Valores de progesterona (ng/mL)														
	1ª medição			2ª medição			3ª medição			4ª medição			5ª medição		
	Valor	Citologia	Data	Valor	Citologia	Data	Valor	Citologia	Data	Valor	Citologia	Data	Valor	Citologia	Data
A	11,56	Estro	12/out	17,02	Estro	13/out	27,42	Estro	14/out	-	-	-	-	-	-
B	40,30	Diestro	30/out	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	7,88	Fim do Proestro	11/nov	8,09	Estro	13/nov	15,06	Estro	15/nov	-	-	-	-	-	-
D	11,93	Estro	04/dez	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	0,85	Início do proestro	11/dez	2,50	Proestro	14/dez	9,05	Estro	16/dez	18,30	Estro	18/dez	-	-	-
F	11,34	Estro	11/dez	29,23	Estro	14/dez	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	9,84	Estro	07/jan	17,10	Estro	09/jan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	1,00	Início do proestro	05/jan	1,79	Início do Proestro	08/jan	2,77	Proestro	11/jan	3,78	Proestro	15/jan	8,70	Estro	17/jan
I	1,02	Início do proestro	10/fev	5,17	Proestro	15/fev	11,25	Estro	16/fev	16,40	Estro	17/fev	-	-	-
J	5,72	Proestro	18/fev	11,87	Estro	19/fev	25,37	Estro	20/fev	-	-	-	-	-	-
K	73,57	Diestro	18/fev	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

 Pico de LH

 Ovulação

### 7.3 Beneficiação

Na Tabela 5 apresentam-se os métodos de beneficiação usados em cada cadela, assim como as datas de beneficiação. Em relação à ocorrência de beneficiação, 90,9 % (n=10) das cadelas foram beneficiadas e as restantes 9,1% (n=1) não foram beneficiadas. Das cadelas beneficiadas (n=10), 80,0 % (n=8) foram inseminadas com sémen fresco, 10,0 % foram inseminadas com sémen refrigerado (n=1) e as restantes 10,0 % (n=1) recorreram a monta natural (Gráfico 1).

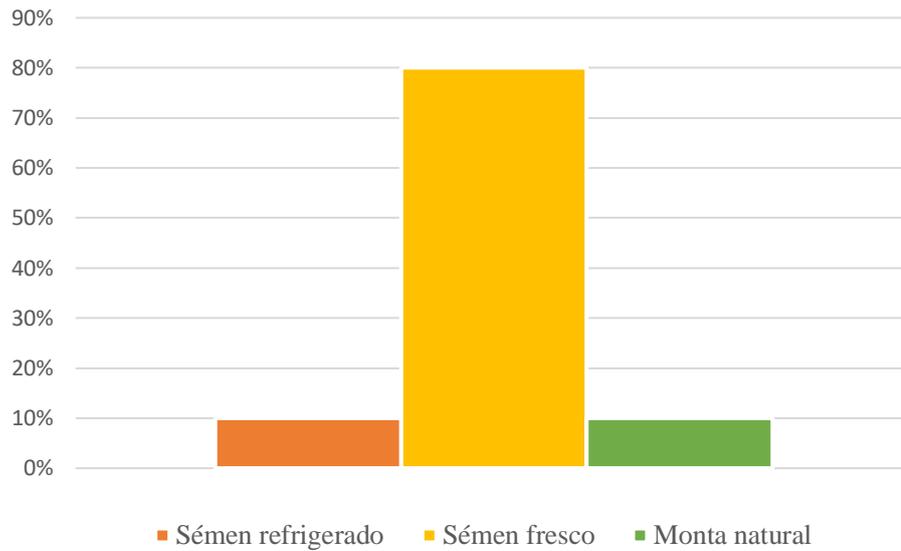


Gráfico 1. Distribuição das cadelas segundo o método de beneficiação a que foram sujeitas

Tendo em conta as datas de beneficiação, 9 das 10 cadelas foram submetidas a duas beneficiações com dois dias de intervalo e, apenas a cadela B, que se apresentou com um valor de progesterona no limite do recomendado para beneficiação, foi inseminada uma única vez.

Os resultados para o diagnóstico de gestação, realizado aos 21-28 dias após beneficiação encontram-se na Tabela 5. Das cadelas beneficiadas (n=10), apenas a cadela B não obteve um diagnóstico de gestação positivo. A avaliação ecográfica desta cadela evidenciou a presença de uma piómetra. Por conseguinte, a taxa de gestação obtida neste estudo foi de 90%.

Tabela 5. Tipo de beneficiação e respetivas datas e diagnóstico de gestação

Cadela	Tipo de beneficiação	Data da beneficiação 1 <sup>a</sup>	Data da beneficiação 2 <sup>a</sup>	Diagnóstico de gestação
A	IA com sémen refrigerado	14/out	16/out	Positivo
B	IA com sémen fresco	30/out	–	Negativo
C	IA com sémen fresco	17/nov	19/nov	Positivo
D	IA com sémen fresco	06/dez	08/dez	Positivo
E	IA com sémen fresco	18/dez	20/dez	Positivo
F	IA com sémen fresco	14/dez	16/dez	Positivo
G	IA com sémen fresco	09/jan	11/jan	Positivo
H	Monta natural	19/jan	21/jan	Positivo
I	IA com sémen fresco	19/fev	21/fev	Positivo
J	IA com sémen fresco	20/fev	22/fev	Positivo
K	Não foi beneficiada			

#### 7.4 Tamanho da ninhada

Para esta parte do estudo, não foram consideradas as cadelas K (de raça American Bully) por não ter sido beneficiada e a cadela B (da raça Cocker Spaniel Inglês) por não ter ficado gestante, ficando em estudo um total de 9 cadelas. Na Tabela 6 apresentam-se as datas do pico de LH e da ovulação, estimadas com base nos valores circulantes de progesterona, bem como o dia registado do parto e o tamanho da ninhada.

Tabela 6. Resultado da beneficiação e respetiva data do parto e tamanho da ninhada

Cadela	Beneficiação em relação ao dia de ovulação		Tamanho da ninhada	Tipo de parto
	Data estimada do pico de LH	Data estimada da ovulação		
A	10/out	12/out	3	Cesariana corretiva
C	11/nov	13/nov	3	Natural
D	02/dez	04/dez	4	Natural
E	14/dez	16/dez	2	Cesariana corretiva
F	09/dez	11/dez	4	Natural
G	05/jan	07/jan	7	Natural
H	11/jan	17/jan	6	Cesariana corretiva
I	14/fev	16/fev	5	Natural
J	17/fev	19/fev	4	Cesariana corretiva

O tamanho médio global da ninhada foi de  $4,22 \pm 1,47$  cachorros. No Gráfico 2 está representada a média do tamanho de ninhada por cada uma das raças estudadas.

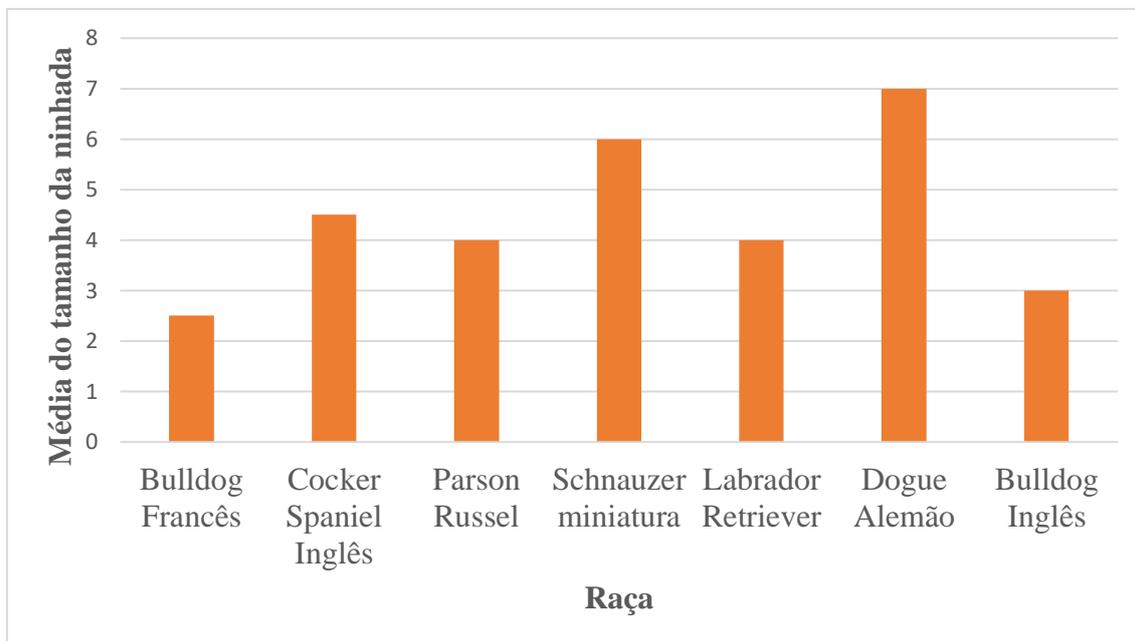


Gráfico 2. Tamanho de ninhada por raça

Das raças em estudo, a raça Dogue alemão (cadela G) foi a que apresentou uma ninhada maior, com 7 cachorros; a raça Bulldog Francês (cadelas A e E) foi a que apresentou uma ninhada mais pequena, com uma média de  $2,5 \pm 0,5$  cachorros.

Em relação ao tipo de parto, as cadelas A, E, H e J foram submetidas a cesariana corretiva, uma vez que, nas ecografias de monitorização, que eram efetuadas nos últimos dois a três dias de gestação, a medição do batimento cardíaco fetal permitiu detetar a existência de stress fetal. De facto, era considerado stress fetal grave, quando o batimento cardíaco fetal era inferior a 170 bpm. Nas restantes cadelas, o parto foi natural.

### 7.5 Relação entre a duração da gestação e o tamanho da ninhada

Neste caso, para prever a data do parto e determinar a duração da gestação foi feito o cálculo em relação ao dia estimado da ovulação (Tabela 7), considerando o dia da ovulação como dia 0 de gestação.

As cadelas que ficaram gestantes apresentaram uma média da duração da gestação de  $61,89 \pm 0,99$  dias, e uma variação da duração da gestação entre os 60 e 63 dias (Tabela 7). A correlação de Pearson não evidenciou existir uma correlação significativa entre a duração da gestação e o tamanho da ninhada para as cadelas em estudo ( $p=0,526$ ).

Tabela 7. Data prevista para o parto, dia do parto e duração da gestação (tendo por base dos cálculos o dia da ovulação)

Cadela	Data prevista para o parto	Dia de registo do parto	Duração da gestação	Tamanho da ninhada
A	14/dez	11/dez	60 dias	3
C	15/jan	14/jan	62 dias	3
D	05/fev	05/fev	63 dias	4
E	17/fev	16/fev	62 dias	2
F	12/fev	10/fev	61 dias	4
G	03/mar	03/mar	63 dias	7
H	20/mar	18/mar	61 dias	6
I	19/abr	18/abr	62 dias	5
J	22/abr	22/abr	63 dias	4

## 7.6 Influência do método de beneficiação no tamanho da ninhada

A amostra é de 9 cadelas ( $n=9$ ) e vai ser avaliada a relação entre o método de beneficiação e o tamanho da ninhada (Tabela 8). O teste de Kruskal-Wallis não evidenciou a existência de uma associação estatisticamente significativa entre o tipo de beneficiação e o tamanho da ninhada na amostra em estudo ( $p= 0,345$ ). A cadela beneficiada por monta natural (cadela H, de raça Schnauzer miniatura) obteve-se uma ninhada de 6 cachorros; a cadela beneficiada por inseminação artificial com sémen refrigerado (Cadela A, de raça Bulldog Francês) obteve uma ninhada com 3 cachorros. Nas restantes cadelas foi realizada inseminação artificial com sémen fresco, tendo sido obtido um tamanho médio de ninhada de  $3,63 \pm 1,93$  cachorros.

Tabela 8. Método de beneficiação e respetivo tamanho da ninhada

Cadela	Raça	Tipo de beneficiação	Tamanho da ninhada
A	Bulldog Francês	IA com sémen refrigerado	3
C	Bulldog Inglês	IA com sémen fresco	3
D	Parson Russel	IA com sémen fresco	4
E	Bulldog Francês	IA com sémen fresco	2
F	Cocker Spaniel Inglês	IA com sémen fresco	4
G	Dogue Alemão	IA com sémen fresco	7
H	Schnauzer miniatura	Monta natural	6
I	Cocker Spaniel Inglês	IA com sémen fresco	5
J	Labrador Retriever	IA com sémen fresco	4

## 8. Discussão

Neste trabalho, utilizaram-se os dados de 11 cadelas de diferentes raças, tendo-se registado um predomínio da raça Cocker Spaniel inglês. A média de idades com que as cadelas se apresentaram foi de 3,0 anos, com uma amplitude de idades entre 1 e 6 anos. O período fértil das cadelas foi estimado através das determinações dos níveis de progesterona em associação com a citologia vaginal correspondente, tendo por base o dia do pico de LH e o dia de ovulação.

A primeira medição foi realizada na altura que os criadores determinaram que a cadela estaria no “cio”, pelo que a grande variação de valores pode ser explicada pela má deteção desta fase. De acordo com Root Kustritz (2010), os valores de progesterona começam a aumentar na altura do pico de LH, atingindo valores entre 2,0 e 2,9 ng/mL (1,5 a 3,5 ng/mL no miniVidas), 24 a 48 horas antes da ovulação. Valores entre 4,0 e 10,0 ng/mL (8,0 a 10,5 ng/mL no miniVidas) são indicadores da ocorrência da ovulação. De facto, a determinação das diversas fases do ciclo éstrico através dos níveis de progesterona séricos, são bastante precisos, pelo que, muitas vezes é utilizada como meio complementar à citologia vaginal, que é uma técnica muito pouco precisa.

No que concerne às citologias vaginais, na primeira visita, quatro cadelas apresentaram a citologia vaginal compatível com a fase do estro (cadelas A, D, F e G), quatro cadelas com o início do proestro (E, H, I e J) e duas cadelas (B e K) apresentaram

um resultado compatível com a fase do diestro. É importante referir que para a distinção entre o estro e o fim do proestro, foram considerados os valores de progesterona, uma vez que, de acordo com Raskin & Meyer (2015), não é possível distinguir estes dois momentos apenas com a citologia vaginal. Naturalmente, sendo esta uma técnica mais subjetiva, existe uma maior possibilidade de erros associados à interpretação pelo operador, como foi referido por Arlt (2018). De facto, o estudo deste autor demonstrou uma elevada heterogeneidade na identificação celular das citologias vaginais e na determinação da ovulação. Para além desta limitação, existe também o fator da experiência do operador que tem uma importante contribuição para a obtenção de uma interpretação mais correta. Deste modo, utilizar a citologia vaginal como o único método para a determinação do dia da ovulação, não é válido. Um outro autor (Meghasree *et al.*, 2019), concluiu que quando utilizada apenas a citologia vaginal para determinação da ovulação, a taxa de conceção foi de apenas 16,67%, enquanto, quando associada a outra técnica, subiu para 91,67%.

Tendo em conta que o período fértil varia consoante o tipo de sémen utilizado, mas que de uma forma geral começa antes do pico de LH e termina cerca de seis a oito dias após o pico de LH, caso se recorra a monta natural ou a IA com sémen fresco, pode-se concluir que das 11 cadelas em estudo, nove delas estão no período fértil. De facto, as cadelas beneficiadas com sémen fresco ou refrigerado tendem a ter um período fértil maior do que quando beneficiadas com sémen congelado, isto porque a qualidade e a vitalidade dos espermatozoides são afetadas pelos métodos de conservação. Na verdade, quando a beneficiação é por monta natural, o período fértil tem uma duração de seis dias, quando a beneficiação é por IA com sémen fresco ou refrigerado tem uma duração de quatro dias e com sémen congelado tem uma duração de dois dias (England & Concannon, 2002). Efetivamente, perante a sua última visita, antes da beneficiação, as cadelas encontravam-se no estro.

Um dos grandes problemas encontrados neste estudo baseia-se na identificação incorreta da fase do cio, por parte dos tutores. Apesar da maioria das cadelas, na primeira visita, terem resultados de citologia e valores de progesterona indicadores de que estavam na fase de cio, duas cadelas B e K estavam completamente fora deste período.

Nesta amostra de 11 cadelas, foram beneficiadas 10 cadelas. Como referido anteriormente, duas das cadelas (cadelas B e K) uma das quais no limiar estimado de fertilidade (cadela B) e a outra fora do período fértil (cadela K). Esta última não foi beneficiada. A segunda foi submetida a uma beneficiação, da qual não resultou gestação. A taxa de fertilidade obtida nestes grupos de animais foi de 90%.

Na grande maioria, as cadelas foram inseminadas com sémen fresco (80%). Das restantes 20%, 10% foram inseminadas com sémen refrigerado e 10% através de monta natural. Como resultado da beneficiação apenas uma cadela não ficou gestante, cadela essa que desenvolveu uma piómetra. De facto, a cadela que não ficou gestante corresponde à cadela B, que se encontrava no fim do período fértil.

A raça Dogue Alemão foi a que apresentou uma ninhada maior (7 cachorros) e a raça Bulldog francês a que apresentou uma ninhada média mais pequena (2,5 cachorros). De acordo com Hollinshead & Hanlon (2017), raças de pequeno porte tendem a apresentar ninhadas mais pequenas que as cadelas de raças de grande porte, o que é genericamente concordante os resultados obtidos neste estudo. De acordo com Borge *et al.* (2011), o Dogue Alemão tem uma ninhada média de  $7,1 \pm 0,6$  cachorros, o Labrador Retriever uma média de  $6,9 \pm 0,2$  cachorros, o Cocker Spaniel Inglês uma média de  $5,7 \pm 0,2$  cachorros, o Bulldog inglês uma média de  $5,4 \pm 0,4$  cachorros, o Bulldog Francês uma média de  $4,7 \pm 0,3$  cachorros e o Schnauzer miniatura uma média de  $4,7 \pm 0,1$  cachorros. Em relação à raça Parson Russel, não foi possível encontrar estudos que indicassem o tamanho médio de ninhada, pelo que não foi possível perceber se o tamanho da ninhada se encontra dentro da média. Neste estudo, apenas a raça Dogue Alemão apresentou um tamanho médio de ninhada dentro dos valores esperados. As raças Labrador Retriever, Cocker Spaniel Inglês, Bulldog Inglês, Bulldog Francês apresentaram um tamanho de ninhada um pouco abaixo do esperado. Por outro lado, a raça Schnauzer Miniatura apresentou um tamanho da ninhada acima do esperado. De facto, estes desvios da média esperada podem ser explicados pelo tamanho da amostra em estudo, que é bastante pequena e algumas das raças estão apenas representadas por apenas uma cadela, e mesmo pela variabilidade individual dos animais que integraram este trabalho.

A relação entre a duração da gestação e o tamanho da ninhada também foi um dos aspetos estudados. A duração da gestação foi determinada tendo em conta a data estimada

de ovulação. Deste modo, há uma maior precisão do que quando calculada em relação à data de beneficiação. Efetivamente, quando calculado em relação ao dia estimado da ovulação, a duração da gestação tem uma média de 63 dias e, quando calculado em relação ao dia estimado do pico pré-ovulatório de LH, a duração da gestação tem uma média de  $65 \pm 0,1$  dias (Arlt, 2020). Todavia, quando calculado em relação à data de beneficiação, a duração tem uma maior variação e pode ir dos 56 aos 72 dias (England & Heimendahl, 2010). Na verdade, neste estudo, as cadelas apresentaram uma média da duração da gestação de  $61,89 \pm 0,99$  dias e uma variação de 60 a 63 dias. Considerando que o dia estimado para o parto foi de 63 dias após ovulação, das 9 fêmeas gestantes apenas 3 cumpriram com o dia previsto (cadela D, de raça Bulldog Inglês; Cadela G, de raça Dogue Alemão; e cadela J, de raça Labrador Retriever). As restantes (cadelas A, C, E, F, H e I), registaram o parto entre um e três dias antes do esperado. Para as cadelas A, E e H o aparente encurtamento da gestação pode ser explicado por terem sido submetidas a cesariana corretiva por se ter verificado stress fetal, na monitorização ecográfica. Para além disso, a cadela J também foi submetida a cesariana corretiva, pelo mesmo motivo. Em animais braquicéfalos, como as cadelas A e E, muitas vezes é necessário recorrer a cesariana corretiva, porque a cabeça dos fetos é muito grande para passar no canal de parto (Ekenstedt *et al.*, 2020). De facto, os resultados obtidos através do estudo estatístico não permitiram estabelecer uma relação, uma vez que o nível de significância é superior a 0,05. Este resultado pode ser explicado pelo facto de a amostra em estudo ser bastante pequena e heterogénea em termos de raças representadas. Apesar de existir evidência de que o ninhadas menores podem alongar a gestação (Eilts *et al.*, 2005; Schaefer-Okkens *et al.*, 2001; Holst & Phemister, 1974), existem também vários estudos que apontam no sentido contrário (Vinaykumar *et al.*, 2021; Kutzler *et al.*, 2003; Linde-Forsberg *et al.*, 1999). São necessários mais estudos envolvendo uma maior representatividade racial e de porte de cadelas, que permitam tomar em consideração a raça e porte, bem como o tipo de sêmen e regime de beneficiação utilizado, ou o local de deposição de sêmen, para poder clarificar este tópico.

Na amostra estudada não foi possível inferir qualquer relação entre o método de beneficiação e o tamanho da ninhada, o que poderá ser explicado pelo reduzido número de animais em estudo ( $n=9$ ) mas também pelo facto de a monta natural e a inseminação com sêmen refrigerado estarem representados por apenas uma ocorrência. Hollinshead &

Hanlon (2017) defendem existe o tipo de sêmen usado afeta o tamanho da ninhada, pois cadelas inseminadas com sêmen congelado tiveram ninhadas significativamente mais pequenas do que cadelas inseminadas com sêmen fresco ( $5.4 \pm 3.1$  vs  $6.2 \pm 3.0$  cachorros por ninhada, respetivamente). Também Borge *et al.* (2011) demonstraram que uma cadela quando beneficiada por monta natural apresenta um tamanho da ninhada superior do que quando beneficiada por inseminação artificial, tendo estes autores reportado uma diminuição de 0,4 cachorros quando usado sêmen fresco e uma diminuição de 1,3 cachorros por ninhada quando usado sêmen congelado, em comparação com a monta natural. Os resultados obtidos na avaliação da relação entre estes dois parâmetros podem depender de diversos fatores como o maneo da beneficiação por diferentes operadores, a qualidade do sêmen utilizado e o local de deposição do sêmen e método usado para inseminação (Groppetti *et al.*, 2015). Para além destes dois fatores, a raça e porte das cadelas, podem ter influenciado os resultados obtidos, isto porque, vários estudos concluíram que há uma relação entre o porte e o tamanho da ninhada, em que quanto maior o porte, maior o tamanho da ninhada e quanto menor o porte, menor o tamanho da ninhada (Borge *et al.*, 2011).

## 9. Conclusão

Neste estudo foi possível avaliar a fase do ciclo éstrico em que as cadelas se encontravam. Recorrendo à determinação dos níveis de progesterona e a citologias vaginais definiu-se a melhor altura para efetuar as beneficiações, procurando aumentar a probabilidade de se obter uma gestação e um tamanho de ninhada adequado à raça. Para além disso, através das datas estimadas da ovulação foi possível determinar com maior precisão a data de parto, que é crucial para que haja uma correta monitorização da gestação e do parto.

Por outro lado, não foi possível estabelecer qualquer associação estatística entre o tipo de beneficiação e o tamanho da ninhada e também entre a duração da gestação e o tamanho da ninhada. De facto, a amostra em estudo é muito pouco representativa o que dificultou a obtenção de resultados. Uma das grandes dificuldades neste trabalho baseou-se na má deteção dosaios pelos tutores e na sua disponibilidade de tempo e financeira para cumprir com os critérios estabelecidos.

## 10. Referências bibliográficas

- Arlt, S. (2018). Canine ovulation timing: A survey on methodology and an assessment on reliability of vaginal cytology. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 53–62. <https://doi.org/10.1111/rda.13352>
- Arlt, S. (2020). The bitch around parturition. *Theriogenology*, 150, 452–457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.046>
- Borge, K. S., Tønnessen, R., Nødtvedt, A., & Indrebø, A. (2011). Litter size at birth in purebred dogs-A retrospective study of 224 breeds. *Theriogenology*, 75(5), 911–919. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.034>
- Christensen, B. (2011). *Canine breeding management-vaginoscopy and progesterone assays*. DVM. <https://www.dvm360.com/view/canine-breeding-management-vaginoscopy-and-progesterone-assays-proceedings>
- Concannon, P., Hansel, W., & Mcentee, K. (1977). Changes in LH, Progesterone and Sexual Behavior Associated with Preovulatory Luteinization in the Bitch. *Biology of Reproduction*, 17(4), 604–613.
- Concannon, P. W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 200–210. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2010.08.028>
- Concannon, P., Whaley, S., Lein, D., & Wissler, R. (1983). Canine gestation length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. *American Journal of Veterinary Research*, 44(10), 1819–1821.
- Davidson, A. P. (2014). The Practice of Theriogenology. Em *Small Animal Internal Medicine* (Fifth edition).
- Ekenstedt, K. J., Crosse, K. R., & Risselada, M. (2020). Canine Brachycephaly: Anatomy, Pathology, Genetics and Welfare. *Journal of Comparative Pathology*, 176, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.02.008>
- England, G., Burgess, C. M., Freeman, S. L., Smith, S. C., & Pacey, A. A. (2006). Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. *Theriogenology*, 66(6–7), 1410–1418. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.025>

- England, G., & Concannon, P. W. (2002). Determination of the Optimal Breeding Time in the Bitch: Basic Considerations. Em *Recent Advances in Small Animal Reproduction*.
- England, G., & Heimendahl, A. (2010). *BSAVA Manual of canine and feline reproduction and neonatology*. British Small Animal Veterinary Association.
- Folnozic, I., Karadjole, T., Bacic, G., & Mačević, N. (2009). Vaginoscopy in bitches. Em *ResearchGate* (Vol. 40).  
[https://www.researchgate.net/publication/342053186\\_Vaginoscopy\\_in\\_bitches](https://www.researchgate.net/publication/342053186_Vaginoscopy_in_bitches)
- Freshman, J. L. (2002). Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 17(3), 104–107. <https://doi.org/10.1053/svms.2002.34326>
- Gloria, A., Contri, A., Carluccio, A., & Robbe, D. (2018). Blood periovulatory progesterone quantification using different techniques in the dog. *Animal Reproduction Science*, 192, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.006>
- Goodman, M. (2001). Ovulation timing: Concepts and controversies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31, 219–235. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(01\)50201-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(01)50201-6)
- Groppetti, D., Ravasio, G., Bronzo, V., & Pecile, A. (2015). The role of birth weight on litter size and mortality within 24h of life in purebred dogs: What aspects are involved? *Animal Reproduction Science*, 163, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.005>
- Hewitt, D., & England, G. (2000). Assessment of optimal mating time in the bitch. *In Practice*, 22(1), 24–33. <https://doi.org/10.1136/INPRACT.22.1.24>
- Hisanaga, T. (2021). Comparison of Three Different Analyzers to Measure Canine Serum Progesterone. Em *Veterinary world*. Oregon State University.
- Hollinshead, F. K., & Hanlon, D. W. (2017). Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. *Theriogenology*, 101, 62–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.021>
- Holst, P. A., & Phemister, R. D. (1974). Onset of diestrus in the Beagle bitch: definition and significance. *American Journal of Veterinary Research*, 35(3), 401–406.

- Hurnik, J. F. (1987). Sexual Behavior of Female Domestic Mammals. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 3(2), 423–461. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)31162-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)31162-2)
- Hussein, H. A., Schuler, G., Conze, T., & Wehrend, A. (2022). Comparison of three progesterone quantification methods using blood samples drawn from bitches during the periovulatory phase. *Veterinary World*, 15(1), 119–123. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.119-123>
- International Canine Semen Bank. (2024). *Progesterone value comparisons for ovulation timing*. [www.coloradoicsb.com](http://www.coloradoicsb.com)
- Kowalewski, M. P. (2014). Luteal regression vs. prepartum luteolysis: Regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. *Reproductive Biology*, 14(2), 89–102. <https://doi.org/10.1016/J.REPBIO.2013.11.004>
- Kowalewski, M. P. (2018). Selected comparative aspects of canine female reproductive physiology. Em *Encyclopedia of Reproduction* (Vol. 2, pp. 682–691). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20527-X>
- Kutzler, M. A., Mohammed, H. O., Lamb, S. V., & Meyers-Wallen, V. N. (2003). Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology*, 60(6), 1187–1196. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00109-2)
- Levy, X., & Fontbonne, A. (2007). Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31(1), 128–134.
- Linde-Forsberg, C., Ström Holst, B., & Govette, G. (1999). Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. *Theriogenology*, 52(1), 11–23. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00106-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00106-5)
- Lulich, J. P. (2006). Endoscopic vaginoscopy in the dog. *Theriogenology*, 66(3), 588–591. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.022>
- Maenhoudt, C., & Dos Santos, N. R. (2021). Vaginal Endoscopy in the Bitch. Em *Veterinary Endoscopy for the Small Animal Practitioner* (pp. 363–381). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119155904.CH7>

- Marti, J. A. (2002). *Vaginal Cytology in the Bitch and Queen*. WSAVA. <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=3846322&pid=11147>
- Martins, A. C., Payan Carreira, R., & Pires, M. A. (2007). MANEIO REPRODUTIVO NA CADELA. Em *Série didáctica, Ciências Aplicadas*, nº 321 UTAD, Vila Real, 64 pp. ISBN: 978-972-669-795-4.
- Meghasree, C. S., Sudha, G., Darshan, C. N., Ravindranath, B. M., Navya, M., & Becha, B. (2019). VAGINAL EXFOLIATIVE CYTOLOGY, SERUM PROGESTERONE AND VAGINOSCOPY FOR BREEDING MANAGEMENT IN BITCHES. *Indian Journal of Canine Practice*, 11(1), 31–34. <https://doi.org/10.29005/IJCP.2019.11.1.031-034>
- Narita, K., Tsumagari, S., & Takeishi, M. (2000). Shrinkage in the Horizontal Dimensions of the Vulva (Vulvar Shrinkage) as an Indicator of Standing Heat in the Beagle. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 36, 556–560. <https://doi.org/10.5326/15473317-36-6-556>
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., & England, G. C. W. (2001). Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. Em *Journal of Chemical Information and Modeling* (Número 9). Saunders.
- Payan-Carreira, R., Miranda, S., & Nizanski, W. (2011). Artificial Insemination in Dogs. Em M. Manafi (Ed.), *Artificial Insemination in Farm Animals*. InTech. <https://doi.org/10.5772/20374>
- Raskin, R. E., & Meyer, D. J. (2015). Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation Guide. Em *Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation Guide*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-06737-6>
- Reynaud, K., Saint-Dizier, M., Tahir, M. Z., Havard, T., Harichaux, G., Labas, V., Thoumire, S., Fontbonne, A., Grimard, B., & Chastant-Maillard, S. (2015). Progesterone plays a critical role in canine oocyte maturation and fertilization. *Biology of Reproduction*, 93(4). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.130955>
- Riquelme, A. S., & Ruiz, F. A. (2017). Biología Gestacional y Predicción del Parto en la Perra. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 28(4), 771–783. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13865>
- Root Kustritz, M. V. (2010). *Clinical Canine and Feline Reproduction : Evidence-Based Answers*. Wiley-Blackwell.

- Schaefer-Okkens, A. C., Dieleman, S., Okkens, A. C., Teunissen, J. M., Van Osch, W., Van Den Brom, W. E., & Dieleman, S. J. (2001). Influence of litter size and breed on the duration of gestation in dogs. *Journal of reproduction and fertility*, *57*, 193–197.
- Senger, P. L. (2012). *Pathways to Pregnancy & Parturition* (3rd edition). Current Conceptions, Inc.
- Siena, G., & Milani, C. (2021). Usefulness of maternal and fetal parameters for the prediction of parturition date in dogs. *Animals (Basel)*, *11*(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ani11030878>
- Valenciano, A. C., & Cowell, R. L. (2020). Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat. In *Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-02017-X>
- Verstegen-Onclin, K., & Verstegen, J. (2008). Endocrinology of pregnancy in the dog: a review. *Theriogenology*, *70*(3), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.038>
- Vinaykumar, Abhilash, Xhoppillil, J., & Aravind, A. (2021). Factors affecting gestation length in small sized breeds of dogs. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *52*(4), 335–338. <https://doi.org/10.51966/jvas.2021.52.4.335-338>
- Zoetis. (2007). *WITNESS LH*. [https://www.zoetisus.com/content/\\_assets/docs/vmips/package-inserts/witness\\_lh.pdf](https://www.zoetisus.com/content/_assets/docs/vmips/package-inserts/witness_lh.pdf)
- Zoetis. (2024). *WITNESS® LH Rapid Test*. <https://www.zoetisus.com/products/diagnostics/rapid-tests/witness-lh>

## Anexos

### Anexo I: Resultados obtidos no teste de normalidade

	Testes de Normalidade					
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
Duração da Gestação	0,209	9	0,200*	0,889	9	0,194
Tamanho da ninhada	0,223	9	0,200*	0,951	9	0,701

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira. a. Correlação de Significância de Lilliefors