

DETECÇÃO DE ESTRO EM CADELAS MONITORADAS POR ULTRASSONOGRRAFIA OVARIANA E CITOLOGIA VAGINAL UTILIZANDO AS COLORAÇÕES DE PAPANICOLAU E PANÓTICO RÁPIDO

Valéria Amorim Conforti¹, Natália Regina de Souza Bravo²,
Gabriel Leite de Freitas³, Valeska Rodrigues⁴

¹Docente do Programa de Mestrado em Ciência Animal, Hospital Veterinário - Universidade de Franca - UNIFRAN, Franca/SP

²Discente do Programa de Mestrado em Ciência Animal da UNIFRAN, Franca/SP

³Discente do curso de Medicina Veterinária da UNIFRAN, Franca/SP

⁴Docente do curso de Medicina Veterinária da UNIFRAN, Franca/SP.

Autor para correspondência: Valéria Amorim Conforti
Hospital Veterinário, Universidade de Franca - UNIFRAN: Av. Dr. Armando Salles
Oliveira, 201 - Cx. Postal 82 - Pq. Universitário - Franca – SP
E-mail: valeria.conforti@unifran.edu.br

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

A detecção do estro é fundamental no manejo reprodutivo das espécies domésticas. Em cadelas, o proestro é evidenciado por corrimento e edema vulvares, e o início do estro é identificado comportamentalmente como o momento em que a fêmea passa a aceitar a cópula. Porém, algumas fêmeas podem não apresentar claramente sinais externos. A ultrassonografia ovariana e citologia vaginal podem auxiliar na detecção do estro. Na literatura, essas técnicas são, normalmente, descritas separadamente. Portanto, os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar os achados concomitantes de citologia vaginal e ultrassonografia ovariana; e 2) comparar os resultados das colorações de Papanicolau e Panótico Rápido. Quatro cadelas da raça Beagle foram monitoradas via ultrassonografia ovariana e citologia vaginal durante um ciclo estral. O dia em que o comprimento ovariano atingiu seu comprimento máximo foi considerado como parte do estro. A citologia vaginal, monitorada a cada 48 horas, indicou que o período de acentuado estímulo estrogênico durou, pelo menos, cinco dias; durante esse período, as porcentagens de células superficiais observadas tenderam ($P \cong 0.05$) a serem mais altas em esfregaços corados por Papanicolau comparados aos corados por Panótico. Os achados concomitantes de citologia vaginal e ultrassonografia revelaram que a porcentagem média de células superficiais observadas no dia de comprimento ovariano máximo foi de 60,5% ($\pm 11,1\%$), e que a predominância de células superficiais no estro permitiu a diferenciação entre essa fase e o início do proestro. Os resultados indicam que a citologia vaginal é eficaz na identificação da fase de alta influência estrogênica na espécie.

PALAVRAS-CHAVE: cães, ciclo estral, epitélio vaginal, ovários, Panótico, Papanicolau, ultrassom.

ESTRUS DETECTION IN BITCHES MONITORED VIA OVARIAN ULTRASONOGRAPHY AND VAGINAL CYTOLOGY USING PAPANICOLAOU AND DIFF-QUICK STAINS

ABSTRACT

Estrus detection is an essential part of any successful reproductive program in domestic species. In bitches, proestrus is evidenced by vulvar discharge and edema, and the onset of estrus is identified behaviorally as the moment when the female accepts breeding. However, some females may not present strong signs of heat. Ovarian ultrasonography and vaginal cytology can help in heat detection. In the literature, these two methods are usually described separately. Therefore, the objectives of this study were: 1) to investigate the concomitant ultrasonographic and cytological findings; and 2) to compare the results using Papanicolaou or Diff-Quick stains. Four female Beagles were monitored via ovarian ultrasonography and vaginal cytology throughout one estrous cycle. The day in which maximum ovarian length was observed was considered to be within estrus. Vaginal cytology, performed every other day, indicated that the period of high estrogenic influence lasted for a minimum of five days; during this time, percentages of superficial cells tended ($P \cong 0.05$) to be higher in Papanicolaou-stained smears compared to those stained by the Diff-Quick method. The concomitant ultrasonographic and cytological results indicated that the mean percentage of superficial cells on the day of maximum ovarian length was 60.5% ($\pm 11.1\%$), and that the predominance of superficial cells during estrus allowed for distinction between this phase and the beginning of proestrus. Results indicate that vaginal cytology is effective in identifying the phase of high estrogenic influence in the species.

KEYWORDS: dogs, estrous cycle, vaginal epithelium, ovaries, Papanicolaou, Diff-Quick, ultrasound.

INTRODUÇÃO

A detecção do estro é essencial para um manejo reprodutivo eficiente nas espécies domésticas. No proestro, a fêmea canina apresenta sinais externos que sinalizam a aproximação do estro. Esses sinais são alterações do aspecto vulvar que se manifestam como edemaciação e presença de corrimento sanguinolento. A fêmea em proestro atrai o macho, mas não aceita a monta. A receptividade ao macho com aceitação da monta só acontece no estro, que, por essa razão, pode ser identificado comportamentalmente (CONCANNON et al., 1989). Algumas fêmeas, no entanto, podem manifestar o chamado cio silencioso, em que a atividade ovariana não é claramente refletida em sinais externos, como os acima descritos (HOLYOAK et al., 2009). Por se tratar de uma espécie monoéstrica, tendo, portanto, de um (1) a dois períodos de ovulação anualmente, a não detecção do estro de uma reprodutora canina pode representar atraso na produção de filhotes de cerca de seis meses, em média, até o surgimento de um novo ciclo (CONCANNON et al., 1989).

Nas diversas espécies domésticas, o monitoramento da função ovariana pode ser usado para estimar o período ideal para a monta ou inseminação artificial, mesmo quando sinais externos não são claramente observados. Em cadelas, o monitoramento da atividade ovariana pode ser feito por dosagem de progesterona sérica, ultrassonografia dos ovários e citologia vaginal (GRANDI & VANNUCCHI, 2014; FELICIANO et al., 2014). A mensuração das concentrações séricas de

progesterona contribui para a determinação da fase do ciclo estral em que a cadela se encontra, e é um método confiável para a identificação do momento ideal para a inseminação natural ou artificial (HIEMSTRA et al., 2001); porém, necessita de apoio laboratorial, o que nem sempre está disponível para o veterinário, além de encarecer o serviço ao proprietário. A ultrassonografia permite a visualização das estruturas ovarianas, como os folículos, e o monitoramento longitudinal do desenvolvimento folicular possibilita a previsão aproximada do momento da ovulação (ROOT KUSTRITZ, 2012). O custo do equipamento ultrassonográfico, no entanto, é a principal limitação desse método. Por outro lado, a citologia vaginal requer apenas materiais de consumo bastante acessíveis e um microscópio simples.

As variações hormonais observadas durante o ciclo estral influenciam o epitélio vaginal, sendo, portanto, reconhecíveis nos esfregaços vaginais (SCHUTTE, 1967). As células do epitélio vaginal são classificadas como: parabasais, intermediárias e superficiais, as quais podem ser nucleadas ou anucleadas (SCHUTTE, 1967). Do proestro ao estro, observa-se um aumento no número de células superficiais, com a mais alta porcentagem de células superficiais anucleadas sendo observada no estro (ROOT KUSTRITZ, 2012).

A determinação da fase do ciclo estral é facilitada pela coloração dos esfregaços vaginais em oposição ao exame direto dos mesmos (AYDIN et al., 2011). Diversos corantes e protocolos de coloração estão disponíveis para utilização em citologia vaginal. Um dos métodos mais utilizados é o de Papanicolau (CARSON & HLADIK, 2009). Porém, este método é relativamente trabalhoso e requer vários reagentes. Alternativamente, existem métodos mais rápidos de coloração de esfregaços, como o Panótico Rápido (GRANDI & VANNUCCHI, 2014), que utiliza apenas três corantes, e é comumente utilizado para esfregaços sanguíneos.

Na literatura, as técnicas de citologia vaginal e ultrassonografia ovariana para monitoramento do ciclo estral em cadelas são, normalmente, descritas separadamente. Portanto, os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar os achados concomitantes de citologia vaginal e ultrassonografia ovariana; e 2) comparar os resultados de citologia vaginal nas colorações de Papanicolau e Panótico Rápido.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Este estudo utilizou quatro fêmeas da raça Beagle, híginas e reprodutivamente intactas, todas provenientes de uma mesma ninhada, que no início do projeto estavam com 10 meses de idade. Os animais foram mantidos juntos em *box* do canil experimental do hospital veterinário da Universidade de Franca, onde ficavam expostos a fotoperíodo natural. As fêmeas receberam ração comercial para cães (Breeding Adult, Royal Canin) na quantidade recomendada e água *ad libitum*. Foi avaliada a higidez das fêmeas previamente ao estudo por meio de exame físico, ultrassonográfico e hemograma completo e painel bioquímico sérico, sendo que não apresentavam histórico de doenças prévias. Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Franca (protocolo nº 052/13).

Monitoramento da Atividade Ovariana

Citologia Vaginal

Semanalmente, foram confeccionadas lâminas de citologia vaginal com o uso de escovinhas ginecológicas estéreis umedecidas com soro fisiológico estéril. Dois esfregaços vaginais foram obtidos de cada animal, sendo um deles corado pelo método de Papanicolau e o outro, por Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, Paraná). As lâminas foram examinadas ao microscópio óptico (x400; Nikon, Eclipse) para a determinação das porcentagens de células parabasais, intermediárias e superficiais (nucleadas e anucleadas) (POST, 1985). Para cada leitura, foram contabilizadas 300 células (POST, 1985).

Com base na proporção de cada tipo celular, ao atingir-se o nível mínimo de sessenta por cento de células superficiais, a citologia vaginal passou a ser avaliada a cada 48 h.

Avaliações Ultrassonográficas

Antes de cada exame ultrassonográfico para a avaliação da atividade ovariana, foi realizado jejum sólido de oito horas. Imediatamente após a confecção das lâminas para citologia vaginal, as fêmeas foram examinadas ultrassonograficamente, observando-se as dimensões dos ovários e a quantidade e dimensões de estruturas ovarianas (i.e. folículos e corpos lúteos). As cadelas foram tricotomizadas e examinadas em decúbito dorsal por ultrassonografia transcutânea utilizando-se aparelho de ultrassom com probe convexa (6.5 mHz; Mindray model DP-2200Vet; Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd.).

As fases do ciclo estral foram determinadas por meio das avaliações ultrassonográficas (AVUs) com base nos achados de YEAGER & CONCANNON (1995), que descreveram o seguinte: 1) os folículos ovarianos tornam-se mensuráveis ao exame ultrassonográfico no proestro; 2) os ovários caninos atingem seu comprimento máximo no estro; 3) o período de ovulação ocorre no estro, de cinco a seis dias antes do momento em que os ovários atingem seu comprimento máximo; e 4) o pico de LH ocorre de um (1) a cinco dias antes da ovulação. Portanto, no presente estudo, tanto o período de ovulação como o de pico de LH foram estimados retroativamente, a partir do dia em que o comprimento ovariano atingiu seu valor máximo. O início do proestro foi considerado como o dia da primeira de uma série de mais de duas AVUs consecutivas em que os folículos ovarianos apresentavam-se mensuráveis.

Análise dos Dados

Os resultados de citologia vaginal estão expressos em porcentagem por tipo celular nas colorações de Papanicolau e Panótico Rápido. Foi calculado o comprimento ovariano médio \pm desvio padrão (DP) durante as diferentes fases do ciclo estral, incluindo o período correspondente ao final do anestro, que antecedeu o início do desenvolvimento folicular no proestro. Os períodos em que as dimensões ovarianas foram utilizadas para o cálculo das médias do comprimento ovariano em cada fase do ciclo estral estão definidos a seguir: anestro (desde o início das avaliações ultrassonográficas até quatro semanas antes do início do aparecimento de folículos mensuráveis via ultrassonografia); proestro (do aparecimento de folículos mensuráveis até o final do período de pico de LH, período este estimado com base nos achados de ultrassonografia ovariana); estro (dia do comprimento ovariano máximo detectado); final do diestro (sessenta dias após o dia do comprimento ovariano máximo). As porcentagens de células superficiais observadas

em esfregaços corados pelos métodos de Papanicolau e Panótico Rápido foram comparadas pelo teste *t* de Student pareado. As médias do comprimento ovariano no proestro, estro e diestro foram comparadas com a média no anestro pelo teste *t* de Student pareado. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (DP) ou média \pm erro padrão (EP), conforme indicado. O nível de significância foi definido como $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comprimento médio ovariano antes do início do primeiro proestro foi de 12,1 (\pm 0,9) mm (Tabela 1), o que está de acordo com o descrito por YEAGER e CONCANNON (1995) para essa fase do ciclo estral em cadelas adultas.

TABELA 1. Comprimento ovariano (média \pm DP) em períodos específicos de cada fase do ciclo estral de cadelas da raça Beagle (n=4): [†]anestro (desde o início das avaliações ultrassonográficas até quatro semanas antes do início do aparecimento de folículos mensuráveis); ^{*}proestro (do aparecimento de folículos mensuráveis até o final do período provável de ocorrência do pico de LH); ^{**}estro (dia do comprimento ovariano máximo detectado); [§]final do diestro (aproximadamente 60 dias após o dia do comprimento ovariano máximo).

Fase do ciclo estral	Comprimento ovariano (mm) média \pm DP
Anestro [†]	12,1 \pm 0,9 ^a
Proestro [*]	13,3 \pm 0,7 ^a
Estro ^{**}	22,0 \pm 2,1 ^b
Diestro (final) [§]	14,5 \pm 1,5 ^a

^{a,b}Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0.001$) pelo teste *t* de Student pareado em comparação ao anestro.

O início dos sinais externos de proestro (i.e. sangramento e edemaciação vulvar) coincidiu com o surgimento de folículos ovarianos de dimensões mensuráveis ao exame ultrassonográfico. No período de tempo decorrido entre o início do proestro e os dias em que estaria ocorrendo o pico de LH, o comprimento ovariano médio foi de, aproximadamente, 13,3 (\pm 0,7) mm (Tabela 1). Nesse mesmo período, os folículos ovarianos variaram em comprimento de 1,65 a 7,18 mm. Esses achados são compatíveis com os de YEAGER & CONCANNON (1995), cujas observações indicaram que o diâmetro folicular em Beagles chega, em média, a cinco mm no dia anterior à ovulação.

YEAGER & CONCANNON (1995) também observaram que os ovários caninos atingem seu tamanho máximo durante o estro, cinco a seis dias após a ovulação. No presente estudo, durante a fase de crescimento folicular e desenvolvimento dos corpos lúteos, os ovários aumentaram de tamanho, apresentando, em média, comprimento máximo de 22,0 (\pm 2,1) mm (Tabela 1). Não foi detectada diferença ($P > 0.05$) entre o comprimento médio ovariano no anestro em comparação ao observado no proestro e após cerca de 60 dias pós-estro;

porém, a média de comprimento ovariano máximo foi maior ($P < 0.001$) do que a média observada no anestro (Tabela 1). As estruturas ovarianas de maior comprimento observadas durante o estro tiveram, em média, comprimento máximo de 10,3 ($\pm 1,3$) mm. As imagens ultrassonográficas não permitiram distinguir com exatidão quando as estruturas ovarianas passaram de folículos a corpos lúteos. YEAGER & CONCANNON (1995) relataram que o diâmetro máximo dos folículos pré-ovulatórios em cães pode chegar a 11 mm e apontaram para o fato de que corpos lúteos e folículos podem não ser diferenciáveis por ultrassonografia. SILVA et al. (1996) monitoraram as alterações ovarianas em cadelas adultas durante o período ovulatório utilizando ultrassonografia, laparoscopia e dosagens hormonais e não conseguiram determinar com exatidão o momento da ovulação por ultrassonografia ou laparoscopia.

Segundo YEAGER & CONCANNON (1995), no diestro, os ovários, assim como os CLs, gradualmente diminuem de tamanho. Neste estudo, 60 dias depois de o comprimento ovariano ter atingido seu valor máximo, os ovários mediram, em média, 14,5 ($\pm 1,5$) mm (Tabela 1).

O período de tempo decorrido entre o primeiro e o último dia em que a citologia vaginal revelou alta (>60%) proporção de células superficiais (por coloração de Papanicolau ou Panótico Rápido) foi considerado como de alta influência estrogênica. Faz-se importante observar que a citologia vaginal era inicialmente avaliada semanalmente, mas passou a ser avaliada a cada 48 h a partir do momento em que foi observada uma proporção de células superficiais de sessenta por cento do total de células examinadas; portanto, o período de alta influência estrogênica pode ter sido um (1) ou dois dias mais longo que o observado.

Nas lâminas de citologia vaginal da Fêmea #1, o período de alta influência estrogênica teve duração mínima de oito dias, com média de 77% (Papanicolau) e 71% (Panótico) de células superficiais (Tabela 2). O quinto dia desse período foi o de maior comprimento ovariano observado ao exame ultrassonográfico (19.0 mm), indicando tratar-se da fase de estro, e teve 80% e 65% de células superficiais, pelas colorações de Papanicolau e Panótico, respectivamente.

TABELA 2. Porcentagens médias de células superficiais observadas em esfregaços vaginais confeccionados durante o período de alta influência estrogênica e corados pelos métodos de Papanicolau ou Panótico Rápido. Os resultados das duas colorações foram comparados pelo test *t* de Student pareado.

Fêmeas #	Células Superficiais (%)		
	Papanicolau	Panótico	
1	77	71	
2	75	55	
3	80	74	
4	78	67	
Média (\pm EP)	77.5 (± 1.0)	66.7 (± 4.2)	$P \cong 0.05$

O período de alta influência estrogênica na Fêmea #2, detectado por meio de citologia vaginal, teve duração mínima de cinco dias, com média de 75% (Papanicolau) e 55% de células superficiais (Panótico) (Tabela 2). No primeiro desses cinco dias, os achados ultrassonográficos eram compatíveis com estro, pois foi observado o comprimento máximo tanto dos ovários (23.3 mm) como da maior

estrutura ovariana, sendo as proporções de células superficiais, nesse dia, de 70% (Papanicolau) e 65% (Panótico).

A Fêmea #3 apresentou altas porcentagens de células superficiais (média de 80% (Papanicolau) e 74% (Panótico) (Tabela 2) durante um período de, pelo menos, oito dias consecutivos. De acordo com as AVUs, esse período de oito dias teria incluído o início do proestro e, possivelmente, o início do estro. O maior comprimento ovariano (23.4 mm) foi observado quando as porcentagens de células superficiais já se encontravam em declínio, tendo sido observados os valores de 15% (Papanicolau) e 44% (Panótico).

A citologia vaginal da Fêmea #4 apresentou altas porcentagens de células superficiais, com média de 78% (Papanicolau) e 67% (Panótico) (Tabela 2) em um período de oito dias consecutivos. De acordo com as AVUs, esse mesmo período teria incluído o estro e, possivelmente, o final do proestro. No dia em que foi observado o comprimento máximo ovariano (22.3 mm), a proporção de células superficiais ainda era relativamente alta (68%, Panótico), mas já havia começado a declinar após pico nos dias anteriores (dados não mostrados).

Na avaliação dos esfregaços confeccionados durante o período de alta influência estrogênica, observou-se uma tendência ($P \cong 0.05$) a se ter porcentagens mais altas de células superficiais nas lâminas coradas pelo método de Papanicolau do que por Panótico Rápido.

A Figura 1 mostra a diferença entre as proporções de células intermediárias e superficiais no início do proestro e no estro. A porcentagem média de células superficiais observadas no mesmo dia em que comprimento ovariano atingiu seu valor máximo (estro) nas cadelas (n=4) foi de 60,5% ($\pm 11,1\%$) (Figura 1).

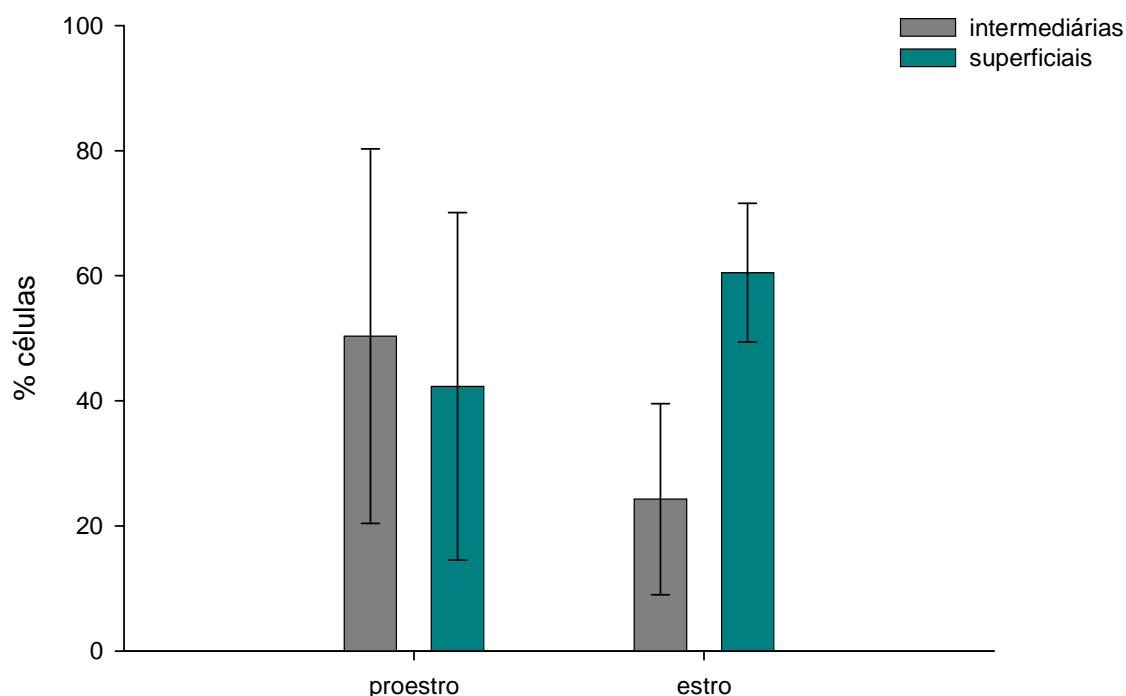


FIGURA 1. Achados concomitantes de citologia vaginal e ultrassonografia ovariana em cadelas da raça Beagle mostrando as porcentagens de células intermediárias e superficiais (média \pm DP) em momentos específicos das seguintes fases do ciclo estral: proestro (primeiro dia em que folículos ovarianos apresentaram-se mensuráveis ao ultrassom); e estro (dia em que o tamanho máximo ovariano foi atingido, conforme mensuração por ultrassonografia).

Nas fêmeas #1, #2 e #4, o maior comprimento ovariano foi observado no período de alta influência estrogênica, mostrando que tanto os achados ultrassonográficos quanto os de citologia vaginal indicavam tratar-se da fase de estro. No caso da fêmea #3, o maior comprimento ovariano foi observado após o período de alta influência estrogênica. Segundo BOUCHARD et al., (1991), a porcentagem de células superficiais começa a diminuir vários dias após a ovulação. Uma possível explicação para o fato de que o comprimento ovariano máximo na fêmea #3 ter sido atingido quando a proporção de células superficiais já estava reduzida seria o comprimento ovariano máximo ter sido atingido na transição do estro para o diestro.

REYNAUD et al., (2010) utilizaram ovários de cadelas ovariectomizadas descreveram os folículos ovarianos nessa espécie como tendo entre dois e oito mm de diâmetro. No presente estudo, as estruturas ovarianas observadas apresentaram as dimensões máximas (10-11 mm), o que está de acordo com o que observaram YEAGER & CONCANNON (1995). A diferença entre os resultados do presente estudo e os de REYNAUD e colaboradores (2010) pode ter tido origem nas diferenças entre as técnicas utilizadas para as mensurações (ultrassonografia *versus* mensuração direta, respectivamente). Esses resultados podem auxiliar o médico veterinário, que utiliza AVUs para determinar o momento de iniciar o protocolo de inseminação artificial.

HIEMSTRA et al., (2001) analisaram achados de citologia vaginal concomitantes com concentrações séricas de progesterona e concluíram que, apesar de não ser confiável para indicar o momento ideal para a inseminação de cadelas, a citologia vaginal por si só é útil para determinar a fase do ciclo estral de modo geral. MSHELIA et al., (2001) relataram predominância de células superficiais no estro em cadelas.

Os achados de citologia vaginal do presente estudo indicaram que o período de acentuado estímulo estrogênico durou, pelo menos, cinco dias. Possivelmente, esse período observado poderia ter sido de um (1) a dois dias mais longo se esfregaços vaginais tivessem sido confeccionados diariamente, ao invés de a cada 48 horas. Essa observação está de acordo com CONCANNON et al. (1989), que relataram ser de sete a dez dias o período em que a citologia vaginal reflete acentuada influência estrogênica. A predominância de células superficiais observadas no estro no presente estudo contribuiu para a diferenciação entre essa fase e o início do proestro e confirmou os achados de ultrassonografia, que apontavam ser aquele o momento em que os ovários atingiram seu comprimento máximo.

CONCLUSÃO

No presente estudo, os achados concomitantes de citologia vaginal e ultrassonografia revelaram que altas porcentagens de células superficiais foram observadas no dia de comprimento ovariano máximo, e que a predominância de células superficiais no estro permitiu a diferenciação entre essa fase e o início do proestro.

Apesar de se ter observado uma tendência a maiores proporções de células superficiais na coloração de Papanicolau do que no Panótico Rápido no período de alta influência estrogênica, o método de Panótico pode ser considerado uma alternativa rápida para detectar esse período em cadelas. Os resultados deste

estudo indicam que a citologia vaginal, mesmo quando usada separadamente, pode ser eficaz na identificação da fase de alta influência estrogênica, sendo, portanto, recomendada como técnica simples e de baixo custo para a identificação dessa fase, auxiliando, assim, no manejo reprodutivo na espécie.

AGRADECIMENTOS

Os discentes Natália Regina de Souza Bravo e Gabriel Leite de Freitas contaram com Bolsas de Mestrado e Iniciação Científica da Capes e da Fapesp (processo nº 2013/11443-0), respectivamente. Os autores também agradecem ao técnico de histopatologia José Luiz de Souza e à professora Roseli Aparecida Leite de Freitas, ambos da UNIFRAN.

REFERÊNCIAS

AYDIN, I.; SUR, E.; OZAYDIN, T.; DINC, D. A. Determination of the stages of the sexual cycle of the bitch by direct examination. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, p. 1962-1967, 2011.

BOUCHARD, G. F.; SOLORZANO, N.; CONCANNON, P. W.; YOUNGQUIST, R. S.; BIRSCHWAL, C. J. Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone. **Theriogenology**, v. 35, p. 603-611, 1991.

CARSON, F. L.; HLADIK, C. **Histotechnology: a self-instructional text**. 3rd ed. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press, 2009.

CONCANNON, P. W.; MCCANN, J. P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 39, p. 3-25, 1989.

FELICIANO, M. A. R.; OLIVEIRA, M. E. F.; VICENTE, W. R. R. **Ultrassonografia na reprodução animal**. São Paulo: MedVet, 2014.

GRANDI, F.; VANNUCCHI, C. I. **Aplicações da citologia vaginal na clínica médica de pequenos animais**. In: BESERRA, H. E. O.; COSTA, L. D. (Org.). Citopatologia veterinária diagnóstica. São Paulo: MedVet, 2014. p. 99-119.

HIEMSTRA, M.; SCHAEFERS-OKKENS, A. C.; TESKE, E.; KOOISTRA, H. S. The reliability of vaginal cytology in determining the optimal mating time in the bitch. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, v. 126, p. 685-689, 2001.

HOLYOAK, G. R.; MAKLOSKI, C.; MORGAN, G. L. **Abortion, abnormal estrous cycle, and infertility**. In: LORENZ, M. D.; NEER, T. M.; DEMARS, P. (Org.). Small animal medical diagnosis. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2009. p. 337.

MSHELIA, G. D.; AMIN, J. D.; CHAUDHARI, S. U. R. Oestrus detection in the Nigerian Mongrel bitch: application of vaginal cytology. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 21, p. 44-46, 2001.

POST, K. Canine vaginal cytology during the estrous cycle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 26, p. 101-104, 1985.

REYNAUD, K.; CHASTANT-MAILLARD, S.; BATARD, S.; THOUMIRE, S.; MONGET, P. IGF system and ovarian folliculogenesis in dog breeds of various sizes: is there a link? **The Journal of Endocrinology**, v. 206, p. 85-92, 2010.

ROOT KUSTRITZ, M. V. R. Managing the reproductive cycle in the bitch. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, p. 423-437, 2012.

SCHUTTE, A. Canine vaginal cytology. III. Compilation and evaluation of cellular indices. **Journal of Small Animal Practice**, v. 8, p. 313-317, 1967.

YEAGER, L. A.; CONCANNON, P. W. **Ultrasonography of the reproductive tract of the female dog and cat**. In: BONAGURA, J. D. (Org.). *Kirk's Current Veterinary Therapy XII*. Philadelphia: WB Saunders, 1995. p. 1040-1052.