



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**

André Silva de Matos

**ESTUDO DA PUBERDADE PRECOCE EM COBAIAS *SHORT HAIR*
MANTIDAS EM UMA INSTALAÇÃO ANIMAL DE CRIAÇÃO**

Orientadora: Dr^a Klena Sarges Marruaz da Silva

Coorientadora: Dr^a Tatiana Kugelmeier

Rio de Janeiro - RJ
2020

André Silva de Matos

**ESTUDO DA PUBERDADE PRECOCE EM COBAIAS *SHORT HAIR*
MANTIDAS EM UMA INSTALAÇÃO ANIMAL DE CRIAÇÃO**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
graduação em Ciências em Animais de Laboratório,
Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos –
FIOCRUZ

Orientadora: Dr^a Klena Sarges Marruaz da Silva

Coorientadora: Dr^a Tatiana Kugelmeier

Rio de Janeiro - RJ
2020

Silva de Matos, André.

ESTUDO DA PUBERDADE PRECOCE EM COBAIAS SHORT HAIR MANTIDAS EM UMA INSTALAÇÃO ANIMAL DE CRIAÇÃO / André Silva de Matos. - Rio de Janeiro, 2020.

74 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2020.

Orientadora: Klena Sarges Marruaz da Silva.

Co-orientadora: Tatiana Kugelmeier.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Cobaia. 2. Reprodução. 3. Citologia vaginal. 4. Puberdade. 5. Detecção de estro. I. Título.

André Silva de Matos

**ESTUDO DA PUBERDADE PRECOCE EM COBAIAS *SHORT HAIR*
MANTIDAS EM UMA INSTALAÇÃO ANIMAL DE CRIAÇÃO**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
graduação em Ciências em Animais de Laboratório,
Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos –
FIOCRUZ

Banca Examinadora:

Dra. Alessandra de Almeida Ramos
Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) - FIOCRUZ, RJ
(Presidente da Banca)

Dra. Diva Anélie de Araújo Guimarães
Universidade Federal do Pará – UFPA, PA (Titular)

Dra. Joanna Maria Gonçalves de Souza Farjan
Universidade Federal Fluminense – UFF, RJ (Titular)

–

Dra. Janaina Barcelos Porto Ferreira
Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) - FIOCRUZ, RJ
(Suplente)

Dr. Luiz Ricardo Berbert
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, RJ
(Suplente)

Dedico esse trabalho aos meus pais, à minha companheira e aos meus irmãos, que são fonte de inspiração para meu crescimento pessoal e motivadores do meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por terem me proporcionado a vida, e cuidado para que eu crescesse de forma ética e digna, respeitando a todos e valorizando todas as conquistas, sem esquecer as pessoas que estavam ao meu lado e do caminho percorrido.

À minha companheira, namorada e esposa, que aceitou caminhar ao meu lado “nas estradas da vida”, compartilhando alegrias, angústias e sonhos. Sempre com uma palavra de incentivo, confiando inteiramente na minha capacidade e nas conquistas dos nossos objetivos.

Aos meus irmãos, que são fonte de inspiração e admiração. São sinônimos de força, alegria, perseverança e união. Tenho enorme orgulho de fazer parte de uma família tão amável.

Aos amigos que a vida proporcionou cultivar, levo um pouco que cada um no coração e é reconfortante as horas de conversas e risadas que vocês me proporcionam, agradeço por deixarem o meu dia mais leve.

A todos os colegas e amigos que deixei no ICTB, agradeço por todo o conhecimento adquirido ao longo dos anos que aí estive. Em especial, aos amigos do SCRL/ICTB, local de trabalho que fez com que me sentisse em casa e terei sempre esse sentimento de pertencimento.

Faço um agradeco em especial ao meu padrinho de casamento, amigo e por que não, mentor no conhecimento de cobaias. Muito abrigado Carlos Henrique, por compartilhar comigo anos de conhecimento de maneira tão generosa. Essa dissertação também é sua.

Às minhas queridas orientadoras, muito obrigado por confiarem no meu trabalho, nas minhas ideias e no meu potencial. Por vezes achei que não seria capaz de concluir o estudo, por outras, duvidava da sua relevância científica e em todas as minhas inseguranças vocês foram a minha certeza de que tudo daria certo.

RESUMO

Animais de laboratório são cruciais no desenvolvimento científico e biomodelos, como as cobaias (*Cavia porcellus*), são importantes na cadeia de desenvolvimento, controle de qualidade de vacinas e medicamentos distribuídos no sistema único de saúde (SUS). Conhecer os parâmetros biológicos e fisiológicos é fundamental na criação e manutenção de animais em instalações animais, assim o manejo é adequado sempre que novas informações são conhecidas, visando o bem-estar e alinhamento aos 3R's. Na busca por conhecimentos dos parâmetros reprodutivos em cobaias, o presente estudo teve como objetivo estudar o início da puberdade, a incidência e frequência do ciclo estral com idade entre 15 e 60 dias em cobaias *short hair*, além de comparar duas técnicas de coloração. As cobaias apresentam uma membrana de oclusão vaginal, que recobre o acesso ao orifício vaginal, a ruptura ocorre de maneira gradual e natural, momentos antes do parto e no período de cio. No presente estudo foram acompanhadas 42 fêmeas, quanto ao status da membrana de oclusão vaginal e, quando observada a ruptura espontânea, foi realizada coleta em *swab* para exame colpocitológico. Foi observado rompimento da membrana de oclusão vaginal em 39 das 42 fêmeas acompanhadas, seis fêmeas apresentaram abertura da membrana vaginal com menos de 21 dias de vida. Foram constatadas, ao longo de todo o estudo, 23 fêmeas com caracterização da fase de estro, exame de citologia esfoliativa vaginal, com esfregaço apresentando predomínio de células superficiais anucleadas, uma dessas fêmeas com idade inferior a 21 dias. O tempo de permanência de abertura da membrana de oclusão vaginal apresentou maior frequência entre 1 e 3 dias ininterruptos, a duração do intervalo da abertura da membrana vaginal ocorrendo com maior frequência entre 18 e 19 dias. Foi possível o acompanhamento de 3 períodos de ciclo estral em parte das fêmeas. As duas técnicas de coloração empregadas possibilitou caracterizar e contabilizar os tipos celulares do epitélio vaginal de cobaias. Os resultados do estudo contribuem com novas informações acerca de dados reprodutivos de cobaias, a idade de início da puberdade e apontou a necessidade de mudança nas práticas de manejo das cobaias e adequação da idade de desmame usualmente utilizados no ICTB / Fiocruz.

Palavras-chaves: Cobaia, reprodução, citologia vaginal, puberdade, detecção de estro, ciência em animais de laboratório.

ABSTRACT

Laboratory animals are crucial in scientific development and biomodels, such as guinea pigs (*Cavia porcellus*), are important in the development chain and in quality control of vaccines and medicines distributed in the Unified Health System (SUS). Knowing the biological and physiological parameters is fundamental in the breeding and maintenance of animals in animal facilities, so the management is adequate whenever new information is known, aiming at the well-being and alignment with the 3R's. In the search for knowledge of reproductive parameters in guinea pigs, this study aimed to study the onset of puberty, the incidence and frequency of the estrous cycle aged between 15 and 60 days in guinea pigs Short Hair, in addition to comparing two cytological staining techniques. Guinea pigs have a vaginal occlusion membrane, which covers access to the vaginal orifice, the rupture occurs gradually and naturally, moments before the parturition and in the heat period. In the present study, 42 females were monitored regarding the status of the vaginal occlusion membrane and, when spontaneous rupture was observed, swab collection was performed for colpocytological examination. Disruption of the vaginal occlusion membrane was observed in 39 of the 42 females followed, six females had an opening of the vaginal membrane with less than 21 days of life. Throughout the study, 23 females were found with estrus phase characterization, vaginal exfoliative cytology exam, with smear presenting predominance of anucleated surface cells, one of these females under 21 days of age. The permanence time of opening the vaginal occlusion membrane was more frequent between 1 and 3 days uninterrupted, the duration of the interval of opening of the vaginal membrane occurring more frequently between 18 and 19 days. It was possible to follow 3 periods of estrous cycle in part of the females. The two staining techniques employed made it possible to characterize and account for the cell types of the guinea pig vaginal epithelium. The study results contribute with new informations about guinea pig reproductive data, the age of onset of puberty and pointed out the need to change guinea pig management practices and adjust the weaning age usually used in the ICTB / Fiocruz.

Keywords: Guinea pig, reproduction, vaginal cytology, puberty, estrus detection, laboratory animal science.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar de cobaia (*Cavia porcellus*), variedade short hair Nas fases adulta (1), juvenil (2) e recém-nascido (3) 7
- Figura 2.** Membrana de oclusão vaginal de cobaia (*Cavia porcellus*). 9
- Figura 3.** Ilustração esquemática representando as diferentes camadas do epitélio escamoso, assim como os tipos celulares correspondentes a cada camada Erro! Indicador não definido.3
- Figura 4.** Esquema para orientação do campo de leitura das lâminas de esfregaço citológico vaginal, de forma a percorrer toda a lâmina, escolhendo os melhores campos de leituras e evitando campos onde não é possível diferenciar os tipos celulares. Rio de Janeiro, 2020..... 21
- Figura 5.** Análise macroscópica da membrana de oclusão vaginal de *Cavia porcellus* com idade entre 15 e 60 dias de vida, do ICTB/Fiocruz. Membrana vaginal fechada (MVF) (A); Inchaço vulva e secreção (B); Membrana vaginal parcialmente aberta (MVPA) (C); Membrana vaginal aberta (MVA) (D), rompimento da membrana de oclusão vaginal. Rio de Janeiro, 2020..... 23
- Figura 6.** Distribuição da idade na primeira abertura da membrana vaginal de *Cavia porcellus* entre 15 e 60 dias de vida. ICTB/Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020..... 266
- Figura 7.** Distribuição da idade à segunda abertura da membrana vaginal de *Cavia porcellus* (30 e 59 dias de vida) no ICTB/ Fiocruz. Rio de Janeiro. 2020..... 28
- Figura 8.** Distribuição da idade à terceira abertura da membrana vaginal de *Cavia porcellus* (46 e 60 dias de vida) no ICTB/ Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020..... 28
- Figura 9.** Distribuição dos tipos celulares do epitélio vaginal, durante fase de MVA de quatro cobaias com idade entre 33 e 60 dias de vida, do ICTB/ Fiocruz. Tipos celulares; Basal (B); Parabasal (PB); Intermediária (I); Superficial nucleada (SN) e Superficial anucleada (AS). Rio de Janeiro, 2020. 311

- Figura 10.** Distribuição da idade na primeira abertura da membrana vaginal e tempo de permanência da MVA em *Cavia porcellus* com idade inferior a 21 dias de vida. ICTB/FIORUZ. Rio de Janeiro, 2020. **32**
- Figura 11.** Médias de peso das fêmeas que apresentaram estro precoce (A) e fêmeas que apresentaram estro após 21 dias (B) aos 20 dias de vida no ICTB/ Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020. **33**
- Figura 12.** Distribuição de células superficiais totais de cobaias com idade inferior a 21 dias de vida no ICTB/ Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020. **33**
- Figura 13.** Distribuição dos tipos celulares do epitélio vaginal da cobaia 20667 com idade entre 20 e 22 dias de vida avaliado no estudo. Tipos celulares; Basal (B); Parabasal (PB); Intermediária (I); Superficial nucleada (SN) e Superficial anucleada (AS). **34**
- Figura 14.** Distribuição média de células epiteliais vaginais em *Cavia porcellus*, com idade de 17 a 60 dias, classificadas como basal (B), parabasal (PB), intermediária (I), superficial nucleada (SN) e superficial anucleada (AS) utilizando a técnica de coloração Panótico e Papanicolau. Rio de Janeiro, 2020 **35**
- Figura 15.** Microscopia ótica do esfregaço vaginal de cobaia, usando coloração Panótico. (A) Leucócito (1), célula superficial nucleada (2) e células sem definição (3); 100x. (B) célula intermediária (4) e célula parabasal (5); 400x. (C) estro, célula superficial anucleada (6) 100x; (D) célula superficial anucleada (6) e célula nucleada (2); 400x. **36**
- Figura 16.** Microscopia ótica do esfregaço vaginal de cobaia, usando coloração Papanicolau. (A) Leucócito (1); (B) célula intermediária (2), célula parabasal (3) e célula superficial nucleada (4); 400x; (C) e (D) estro, célula superficial anucleada (5), 100x e 400x **37**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Laureados ao Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina que utilizaram cobaia como biomodelo.....	6
Quadro 2. Duração nas fases do ciclo estral em cobaias.....	11
Quadro 3. Classificação do estágio da membrana de oclusão vaginal em <i>Cavia porcellus</i> no ICTB. Rio de Janeiro, 2020.....	188
Quadro 4. Etapas da técnica Panótico para colocação de lâminas citológicas.....	19
Quadro 5. Etapas da técnica Papanicolau para a coloração de lâminas citológicas.....	20
Quadro 6. Descrição dos critérios da avaliação qualitativa das lâminas com esfregaços citológicos vaginais de cobaia (<i>Cavia porcellus</i>). Rio de Janeiro, 2020.....	211

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Observação das aberturas da membrana vaginal (AMV) de *Cavia porcellus* do ICTB/Fiocruz, quantitativo de fêmeas, média e desvio padrão, da idade em que a AMV foi constatada e duração, além do intervalo entre as aberturas. Rio de Janeiro, 2020. **244**
- Tabela 2.** Duração, frequência e proporção do total de intervalo de AMV avaliados em *Cavia porcellus*, entre 15 e 60 dias de vida, no ICTB/Fiocruz, com destaque para os intervalos de duração mais frequentes. Rio de Janeiro, 2020. **25**
- Tabela 3.** Tempo de permanência da abertura da membrana vaginal em *Cavia porcellus* com 15 a 60 dias de idade no ICTB/Fiocruz, com destaque para as durações mais frequentes. Rio de Janeiro, 2020..... **25**
- Tabela 4.** Frequência da observação de membrana vaginal parcialmente aberta, dias antes e dias após a membrana vaginal aberta em *Cavia porcellus* com idade entre 15 e 60 dias de vida no ICTB/ Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020..... **26**
- Tabela 5.** Duração em dias da 1ª abertura da membrana vaginal (MV) de *Cavia porcellus* entre 15 e 60 dias de vida no ICTB/Fiocruz, com destaque para as durações mais frequentes. Rio de Janeiro, 2020. **27**
- Tabela 6.** Duração em dias da 2ª abertura da membrana vaginal (MV) de *Cavia porcellus* entre 15 e 60 dias de vida, no ICTB/Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020. **27**
- Tabela 7.** Distribuição da presença dos tipos celulares na observações das lâminas microscópicas do epitélio vaginal de cobaias (*Cavia porcellus*) com idade entre 15 e 60 dias de vida, avaliadas nesse estudo. Rio de Janeiro, 2020..... **29**
- Tabela 8.** Distribuição média e desvio padrão entre o perfil dos tipos celulares na caracterização das fases estral em cobaias (*Cavia porcellus*) estudadas no ICTB / Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020..... **300**
- Tabela 9.** Distribuição média e desvio padrão dos tipos celulares na caracterização do estro, realizadas com as técnicas de coloração Panótico e Papanicolau, em cobaias (*Cavia porcellus*) estudadas no ICTB/ Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020 **35**

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANOVA – Análisa de Variância

CONCEA – Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

EDA – Experimental Design Assistant

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

ICTB – Instituto de Ciência e Tecnologia m Biomodelos

MV – Membrana vaginal

MVA – Membrana vaginal aberta

MVPA – Membrana vaginal parcialmente aberta

NC3Rs – National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals
in Research

POP – Procedimento Operacional Padrão

SCRL – Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos

ScPRIM – Serviço de Primatologia

SUS – Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Histórico do uso de cobaias na experimentação	3
2.2. Características biológicas da <i>Cavia porcellus</i> (Cobaia)	6
2.2.1. Comportamento	7
2.2.2. Dados reprodutivos	8
2.3. Determinação do ciclo estral	10
2.3.1. Células do epitélio vaginal	12
2.3.2. Colpocitologia	13
2.3.3. Técnicas de coloração de lâminas de citologia vaginal	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. Aspectos éticos	17
4.2. Instalação animal e manejo	17
4.3. Delineamento experimental	17
4.4. Citologia vaginal	18
4.5. Análise dos resultados	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Avaliação dos ciclos estrais entre 15 e 60 dias de vida	23
5.1.1. Abertura da membrana de oclusão vaginal, 1ª abertura.	26
5.1.2. Abertura da membrana de oclusão vaginal, 2ª abertura.	27
5.1.3. Abertura da membrana de oclusão vaginal, 3ª abertura.	28
5.1.4. Citologia esfoliativa vaginal de <i>Cavia porcellus</i>	29
5.2. Puberdade antes de 21 dias de vida.	31
5.3. Comparação das técnicas de coloração Panótico rápido e Papanicolau	34
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICES	56

1. INTRODUÇÃO

As cobaias (*Cavia porcellus*) são roedores criados em instalações animais para uso científico no Brasil e em outros países, esse biomodelo é de grande importância no meio científico, especialmente na cadeia de controle de qualidade de vacinas e medicamentos distribuídos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), além de fornecimento de sangue e hemoderivados para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico de doenças, especialmente na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Segundo os guias e manuais de criação e manejo de cobaias (ANDRADE, 2006; HUBRECHT, 2010; LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2017), estes animais possuem um período de gestação médio de 68 dias e o desmame deve ocorrer aos 21 dias de vida. O Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), em sua Resolução Normativa Nº 33 de 2016, recomenda o desmame das cobaias com idade entre duas e três semanas de vida. O CONCEA sugere também o desmame tendo como parâmetro o peso, ou seja, quando os animais alcançam peso igual ou superior a 180 gramas (BRASIL. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA, 2016). Entretanto, essa ainda não é uma prática utilizada pelas instituições de criação deste biomodelo. No Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos (SCRL/ICTB), o fornecimento das cobaias ocorrem usualmente a partir do desmame até os 60 dias de vida. As cobaias que apresentam estro em idade inferior a 21 dias, período em que ainda se encontram no grupo familiar, abrem a possibilidade para que ocorra cobertura do pai. Desta forma, ocasionando uma prenhez fora do planejamento de manejo, de difícil detecção durante o desmame, e que somente seria detectado após o terço final de gestação, ou seja, após o seu fornecimento.

Nesse contexto, a compreensão do ciclo estral e a determinação da idade em que ocorre a puberdade, possibilita a mudança no manejo reprodutivo de cobaias e assegura que fêmeas com gestações não programadas não sejam utilizadas em ensaios biológicos. O risco de fornecimento de animais gestantes, sem constar no protocolo, é uma preocupação ética, além de ser uma variável experimental, uma vez que durante a gestação ocorrem alterações nos parâmetros fisiológicos, imunológicos, anatômicos e comportamentais. A adequação do manejo contribui ainda para a redução do excedente de animais nas criações, ou seja, indivíduos não fornecidos por impedimento devido à condição de gestação e nascimentos de animais fora do planejamento populacional das colônias.

Com esse estudo pretendeu-se verificar, por meio de citologia vaginal e observação da membrana de oclusão vaginal, avaliar os ciclos estrais em animais com idade entre 15 e 60 dias. A partir dos resultados, foram propostas metodologias de monitoramento do ciclo estral e mudanças no manejo reprodutivo das cobaias mantidas no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nos séculos XIX e XX, a *Cavia porcellus* (cobaia) foi de grande importância em diversos trabalhos científicos, o que induziu os pesquisadores e a comunidade científica a utilizarem o termo “cobaia” para qualquer animal submetido à experimentação. Segundo o dicionário Michaelis (2018), cobaia é qualquer animal submetido a experiências laboratoriais e/ou quem é alvo de experimentos científicos em laboratórios.

2.1. Histórico do uso de cobaias na experimentação

A presença da cobaia (*Cavia porcellus*), também conhecida como porquinho-da-índia, no cotidiano humano vem de longa data. Segundo Weir (1974) e Künzl e Sachser (1999) há relatos de criação destes animais pelos povos originários da região dos Andes na América do Sul há mais de 5 mil anos. O principal objetivo da domesticação é o fornecimento de carne. Em meados do século XVI, os espanhóis descobriram as cobaias e introduziram a espécie na Europa, a qual rapidamente se tornou um animal de estimação popular (KALISTE, 2007). Segundo Lord; Collins; Defrance *et al.* (2020) identificaram que as cobaias domesticadas (*Cavia Porcellus*) inicialmente introduzidas no Caribe, são de origem peruana, são também do Peru as primeiras cobaias transportadas como parte do comércio animal de estimação, para a Europa e o sudoeste dos Estados Unidos. Demonstraram a ocorrência de uma reintrodução moderna, da Europa para Porto Rico, utilizada pelos habitantes locais como fonte de alimento.

Na língua inglesa encontra-se o nome *Guinea pig*, mas não se tem ainda ao certo a origem desse nome. Uma das versões é que os animais se parecem com pequenos porcos e emitem sons estridentes. A primeira parte do nome em inglês, *Guinea*, pode ter derivado dos países Guayana ou Guiana Francesa, porque os animais chegavam por navios da América do Sul vindos desses países (KALISTE, 2007). Outra hipótese do surgimento do nome seria por conta dos navios que transportavam as cobaias para a Europa, faziam parada na Guiné, na costa oeste da África, e o animal poderia ter sido nomeado em razão da moeda desse período, a guiné (SUTHERLAND; FESTING, 1987).

A cobaia foi utilizada para elucidação de grandes questões científicas. Na Alemanha, Nuttal e Thierfelder (1895), por meio de cesarianas assépticas, realizaram testes para obter cobaias “livres de germes”, sendo os primeiros animais de laboratório a serem utilizados a partir dessa técnica. No final do século XIX, houve destaque para os estudos de Robert Koch sobre a tuberculose (KOCH, 1882). A contribuição como biomodelo se estende a diversos

estudos, tais como os de Glen King (1928) no isolamento e identificação da vitamina C, na compreensão dos mecanismos de ação e imunização das vacinas antitetânica (JONES; JAMIESON, 1936; SMITH, 1964) e contra a difteria (YOUNG; MOOD, 1945; ZINNEMANN, 1945). Na Fiocruz, a cobaia foi utilizada como biomodelo em pesquisa de manutenção de reservatórios da doença de Chagas, mesmo na ausência de vetores invertebrados (SHERLOCK; MUNIZ, 1976).

Há outros trabalhos que são referências no meio acadêmico, como os estudos de Deanesly (1966, 1968) e Stockard e Papanicolaou (1919), com grande contribuição nas áreas de histologia e fisiologia reprodutiva, possibilitando compreender a biologia das cobaias.

Sabe-se que, após intensa utilização da espécie, ocorrida na década de 1960, em sua grande parte em estudos sobre tuberculose, o número de cobaias empregadas anualmente em pesquisas biomédicas diminuiu sensivelmente (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2017).

Os trabalhos mais recentes mostram a importância no uso da cobaia na pesquisa biomédica, como os estudos sobre tuberculose, em que Williams; Goonetilleke; Mcshane *et al.* (2005) buscaram uma nova estratégia de vacinação para a proteção de adultos. Além da utilização desse biomodelo em novas linhas de pesquisas, tais como o estudo de Kumar; Krause; Azouz *et al.* (2017) que utilizaram cobaias para a compreensão dos mecanismos de infecção e para avaliação de vacinas e terapêuticos contra o Zika vírus. Outro estudo tendo o vírus Zika como agente infeccioso, sugere que as cepas naturalmente circulantes não são patogênicas durante a gravidez de cobaias imunocompetentes e não interferem no desenvolvimento normal dos filhotes (BIERLE; FERNÁNDEZ-ALARCÓN; HERNANDEZ-ALVARADO *et al.*, 2017).

Além do Zika, outros vírus foram tema de pesquisas, como os estudos realizados por Cashman; Wilkinson; Wollen *et al.* (2017) com intuito do desenvolvimento de vacinas de DNA otimizadas contra a febre de Lassa e o vírus da febre hemorrágica (Ebola). Zhang; Xu; Zhang *et al.* (2017) revelaram características da resposta imune inata da cobaia, mostrando-se resistentes ao vírus influenza aviária H5N1, altamente patogênico, e uma grande preocupação para pandemia. Pinheiro; Paranaíba; Alves *et al.* (2018) demonstraram o papel do extrato da glândula salivar desse roedor durante o curso da infecção por *Leishmania enriettii*. Além disso, a cobaia é também um dos biomodelos recomendados para estudos pré-clínicos relacionados à asma (CANNING; CHOU, 2008; MEURS; SANTING; REMIE *et al.*, 2006; PAZHOOHAN; RAOUFY; JAVAN, 2017).

O papel da cobaia, na contribuição à ciência e à saúde pública, fica evidente quando observamos os trabalhos condecorados, ao longo de décadas, com o prêmio Nobel de fisiologia e medicina, em que o biomodelo foi utilizado (Quadro 1).

A *C. porcellus* é também biomodelo para estudos de nutrição, farmacologia, fisiologia, imunologia, análises clínicas, testes de reativos biológicos e é o animal de eleição para a observação de complementos (ANDRADE, 2006; LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2017), sendo comumente utilizada em pesquisas nas áreas de toxicologia e desenvolvimento de produtos e controle de qualidade (HUBRECHT, 2010).

Quadro 1. Laureados ao Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina que utilizaram cobaia como biomodelo.

Ano	Laureados	Contribuição para a ciência
1901	Emil Adolf vonBehring	Desenvolvimento de anti-soro de difteria.
1908	Ilya IlyichMechnikov Paul Ehrlich	Reações imunológicas e funções de fagócitos.
1919	Jules Bordet	Mecanismos de imunidade.
1928	Charles Jules Henri Nicolle	Patogênese do tifo.
1952	Selman Abraham Waksman	Descoberta da estreptomicina, o primeiro antibiótico eficaz contra a tuberculose.
1961	Georg von Békésy	Mecanismo Físico de Estimulação na Cóclea.
1968	Marshall W. Nirenberg	Interpretação do código genético e sua função na síntese de proteínas.
1972	Gerald M. Edelman Rodney R. Porter	Modelos da estrutura das moléculas de imunoglobulina G (IgG).
1974	Albert Claude Christian de Duve George E. Palade	Organização estrutural das células e descrição do Retículo endoplasmático
1980	Baruj Benacerraf George D. Snell	Identificação de antígenos de histocompatibilidade e mecanismo de ação.
1982	Sune K. Bergström Bengt I. Samuelsson John R. Vane	Isolamento, identificação e análise de prostaglandinas E e F.
1988	Sir James W. Black	Descobertas de princípios importantes para o tratamento medicamentoso.
1994	Martin Rodbell	Descoberta de proteínas G e o papel dessas proteínas na transdução de sinal em células

Fonte: Foundation for Biomedical Research, 2018.

2.2. Características biológicas da *Cavia porcellus* (Cobaia)

As variedades de *C. porcellus* são identificadas pelo tamanho e pela direção dos pelos. A inglesa (Dunkin – Hartley) apresenta pelo curto (*Short hair*), liso e macio, foi criada e estabelecida em 1926 (DUNKIN; HARTLEY; LEWIS-FANING *et al.*,1930). É a variedade mais comum utilizada em pesquisas biomédicas (Figura 1).

Figura 1. Exemplos de cobaia (*Cavia porcellus*), variedade *short hair*, nas fases adulta (1), juvenil (2) e recém-nascido (3)



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

C. porcellus recém-nascidas possuem cerca de 60 a 100 g, apresentam pelagem completa, os olhos abertos e orelhas descoladas. Poucas horas após o nascimento as cobaias já se locomovem facilmente e os dentes secundários já substituem os dentes decíduos durante o desenvolvimento fetal. No dia do nascimento, filhotes começam a comer alimentos sólidos e a beber água, embora a lactação dure duas à três semanas (HUBRECHT, 2010).

Os machos atingem sua maturidade sexual de duas à três meses de idade e quando apresentam massa corporal de cerca de 500 g, enquanto que, as fêmeas podem atingir a maturidade sexual com menos de um mês de idade e uma massa corporal de cerca de 300 g (KALISTE, 2007; HUBRECHT, 2010). As cobaias vivem em média oito anos e atingem uma massa corporal de cerca de 800 g à mais de 1000 g. Os adultos podem medir até 30 cm de comprimento (SUTHERLAND; FESTING, 1987).

2.2.1. Comportamento

C. porcellus são sociáveis, mas se assustam facilmente em decorrência de estímulos externos ou até mesmo de dentro da gaiola. A organização social das cobaias é definida por comportamento agonístico e o desenvolvimento de hierarquias de dominância (KALISTE, 2007; HUBRECHT, 2010). As glândulas adanais e supra-caudais são usadas para demarcação do ambiente (MONTICELLI, 2005). Em interações agonísticas ou de cortejo, as cobaias apresentam sinais visuais como pilo-ereção, saltos com contorção e demonstração de lordose. *C. porcellus* possuem um repertório extenso de vocalização, o qual é associado a vários contextos: encontros amigáveis, separação entre filhotes e mãe, oferta de alimentos, acesso de pessoas à área de criação, e cortejo para acasalamento (MONTICELLI, 2000).

As cobaias não apresentam um ciclo de atividade diurno-noturno. Em vez disso, eles são caracterizados por um ritmo ultradiano, isto é, fases alternadas de atividade e repouso que duram cerca de duas à três horas. Assim, a atividade desses animais não é dependente do regime claro-escuro (SACHSER; LICK; BEER *et al.*, 1992).

2.2.2. Dados reprodutivos

As cobaias são poliéstricas não sazonais com ovulação espontânea e corpo lúteo com atividade secretória ativa. Alguns autores descrevem o surgimento da puberdade entre 55 e 70 dias, com o primeiro cio por volta dos 68 dias de idade e uma variação de 21 dias para mais ou menos (ANDRADE, 2006; LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2017). Segundo Kaliste (2007) e Hubrecht (2010), no entanto, as fêmeas podem atingir a maturidade sexual com idade inferior a um mês de vida. O ciclo estral é relatado, entre 15 à 17 dias (LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997; STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1919; HUBRECHT, 2010), entretanto para outros autores, fica entre 14 à 16 dias (KÜHNEL; MENDOZA, 1992; WANG; LIU; TIAN, *et al.* 2010; LI; SHEN, 2015).

O período de gestação varia entre 59 e 72 dias, com média de 65 dias. O número de filhotes pode variar de um à oito por parto, com média de três filhotes. O cio pós-parto é bastante frequente e ocorre horas após o parto, assim as fêmeas tornam-se receptivas imediatamente após o parto (ANDRADE, 2006; LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2017; HUBRECHT, 2010). Durante o estro as cobaias mostram algumas mudanças comportamentais como aumento da atividade locomotora e das frequências de comportamento de marcação (BIRKE, 1981).

As cobaias possuem uma membrana de oclusão do canal vaginal, que se rompe durante o cio ou durante o parto para a passagem dos filhotes (STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1919) (Figura 2). Esse fenômeno é descrito também em outros roedores

caviomorfos, como: *Trinomys yonenagae* em que a membrana vaginal tem a sua primeira abertura com idade entre 61 à 120 dias de vida, em média aos 95,2 dias (LUCHESE, 2010), *Cavia aperea* (SILVEIRA; MACHADO, 1971; TOUMA; PALME; SACHSER, 2001), *Cuniculus paca* (REIS, 2009; RIBEIRO; RUMPF; SATAPRA *et al.*, 2012). A membrana de oclusão do canal vaginal não está presente apenas na fase jovem da cobaia, pois a cada ciclo estral essa estrutura é destruída e reconstruída, e ocorre por toda a vida da fêmea (STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1919).

Figura 2. Membrana de oclusão vaginal de cobaia (*Cavia porcellus*).



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

De acordo com Stockard e Papanicolaou (1919),

“A membrana de oclusão da vagina é delgada e delineada, composta simplesmente por epitélio escamoso estratificado que cresceu a partir das bordas dos lábios sobre o orifício. Não contém vasos ou sangue, possui a mesma aparência lustrosa que o epitélio de superfície cobrindo a região dos lábios vaginais, com aparência de continuidade. A ruptura da membrana de oclusão vaginal ocorre de maneira natural, pouco antes do estro a vulva se apresenta com inchaço, fazendo pressão na membrana que estica e se rompe, no período em que fêmea está no cio e pronta para copular.”

A membrana vaginal está presente na periferia dos genitais da cobaia e se ausenta por três à sete dias, coincidindo com os estágios de proestro, estro e metaestro (LUNA; CORTÉS; FLORES, 2003). Nas fêmeas maduras, a membrana vaginal abre-se entre um à

três dias durante o estro, mas no primeiro ciclo esse período pode ser mais prolongado e o fechamento ocorre após a ovulação (ARANÍBAR; ECHEVARRÍA, 2014). Segundo Li e Shen (2015) as características morfológicas da vulva em cobaias sofrem pequenas alterações entre as fases do ciclo estral, apresentando inchaço, vermelhidão e secreção no proestro e estro e no metaestro apresenta a membrana levemente fechada e cor clara.

O fato de apresentarem um ciclo estral mais longo, quando comparado à outros roedores utilizados como biomodelos, possuem estro bem caracterizado e período folicular ovariano similar ao dos seres humanos (LI; SHEN, 2015), coloca a cobaia como um excelente biomodelo também para o estudo da biologia reprodutivas humanas (SUN; ZHANG; HAN *et al.* 2014).

2.3. Determinação do ciclo estral

A regulação do ciclo estral é realizada por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente os hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os esteróides secretados pelos ovários (HAFEZ, 2004). Os hormônios esteroides, em diferentes espécies de mamíferos, tem papel relevante no estágio de desenvolvimento folicular, maturação oocitária e formação do corpo lúteo. Pincipalmente estradiol, progesterona e andrógenos (LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011).

O ciclo estral pode ser dividido em fase folicular, onde ocorre crescimento e maturação dos folículos ovários, estimulados pela gradual secreção de estrógeno (HAFEZ, 2004). A fase lútea, que é estimulada pelo aumento da concentração de progesterona no início da ovulação (LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011).

O ciclo estral em cobaias é caracterizando por dois picos hormonais, o primeiro ocorre no proestro, associado a um aumento nos níveis de estradiol (ALKHALAF; PROPPER; CHAMINADAS *et al.* 1992), o segundo pico, de progesterona, ocorre no diestro, onde o estradiol demonstra níveis baixos (ALKHALAF; PROPPER; CHAMINADAS *et al.* 1992). O estro é caracterizado por um pico na concentração de hormônio luteinizante (LH) (TREWING; CHAFFIN; WATANABE *et al.* 1998). O estradiol tem ação miogênica estimulando o espessamento das células do epitélio vaginal mais superficial, já a progesterona provoca descamação das camadas superficiais e diminuição do epitélio vaginal (DEANESLY, 1966).

Quando as fêmeas possuem ciclo poliéstrico e a atividade cíclica é contínua, as fases do ciclo estral são denominadas de proestro, estro, metaestro e diestro, e há grande variação

quanto a duração do ciclo estral (LUCHESE, 2010). No Quadro 2 é possível visualizar a diferença, entre autores, na duração das fases do ciclo estral.

A citologia vaginal permite determinar as fases do ciclo ovariano pela caracterização e incidência dos tipos celulares. As células do epitélio vaginal apresentam diferenças marcantes nos quatro estágios do ciclo estral em cobaias (LI; SHEN, 2015).

Observa-se no proestro a presença abundante de muco e células intermediárias grandes e pequenas (KÜHNEL; MENDOZA, 1992). No estro há grande quantidade de células superficiais, de forma poliédrica e de núcleo pequeno, de difícil visualização, encontrando-se também células superficiais anucleadas (KÜHNEL; MENDOZA, 1992; LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997). No metaestro verifica-se pouca quantidade de leucócitos, células intermediárias e redução da quantidade de células superficiais (KÜHNEL; MENDOZA, 1992). No diestro observa-se uma maior quantidade de leucócitos, pouca quantidade de células intermediárias (KÜHNEL; MENDOZA, 1992).

Quadro 2. Duração nas fases do ciclo estral em Cobaias.

Espécie	Autor(es)	Duração				Ciclo total
		Pro-estro	Estro	Meta-estro	Diestro	
Cobaia (<i>Cavia porcellus</i>)	Lilley, Epping e Hafner (1997)	2 - 4 dias	8 - 24 horas	2 - 4 dias	8 - 10 dias	15 - 17 dias
	Shomer, Holcome, Harkness (2015)	1 - 1,5 dias	8 - 11 horas	3 dias	11 - 12 dias	16 dias
	Alkhalaf, Propper, Chaminadas et al (1992)	1 dia	1 dia	2 dias	10 dias	16 dias

Em outros roedores, como o camundongo, observa-se no proestro células epiteliais basais e intermediárias. O estro tem predomínio de células anucleadas, isoladas ou em grumos. O metaestro apresenta células do tipo epitelial basal e intermediária, células anucleadas e a presença de leucócitos. No diestro o esfregaço vaginal é caracterizado por elementos celulares escassos com grande concentração de muco e de leucócitos polimorfonucleares (MENDONÇA; EVÊNCIO-NETO; SIMÕES, 2007).

O rato, linhagem *Wistar*, no proestro há predomínio de células epiteliais nucleadas, no estro há um predomínio de células cornificadas, o diestro I apresenta predomínio de leucócitos e a presença de células cornificadas e epiteliais e no diestro II ocorre o predomínio de leucócitos. (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; BARRIL; GRISOTTO; COELHO, 2016).

Na fase do estro em preás (*Cavia aperea*) observa-se no esfregaço vaginal, no estágio 1, grande quantidade de células superficiais mucosas, poucos leucócitos e presença de muco. No estágio 2 há predomínio de células superficiais queratinizadas, no estágio 3 ocorre elevado número de célula basal e no estágio 4 há presença de células basais e polimorfonucleares. Enquanto que na fase do diestro, estágio 1, ocorre a presença de muco e leucócitos, e no diestro de células diéstricas, leucócitos e muco (SILVEIRA; MACHADO, 1971). Segundo Toumar, Palme e Sachser (2001) o estro é descrito com a seguinte distribuição celular: células superficiais e intermediárias tardias dominam os esfregaços durante os primeiros dias de abertura vaginal, e diminuíram subsequentemente, enquanto o número de células parabasais aumentaram.

Já em cutias, o proestro tem predomínio de células superficiais anucleadas, intermediárias e parabasais. No estro, apresentam em maior quantidade células superficiais nucleadas e anucleadas, além da ausência de leucócitos. No metaestro, a uma frequência maior de células intermediária e leucócitos. No diestro, células parabasal (GUIMARÃES; MOREIRA; VALE, 1997).

2.3.1. Células do epitélio vaginal

A mucosa do canal vaginal é constituída pelo epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado e lamina própria de tecido conjuntivo, apresentando as seguintes camadas: basal, parabasal, intermediária e superficial (LIMA, 2012), como apresentado na (Figura 3).

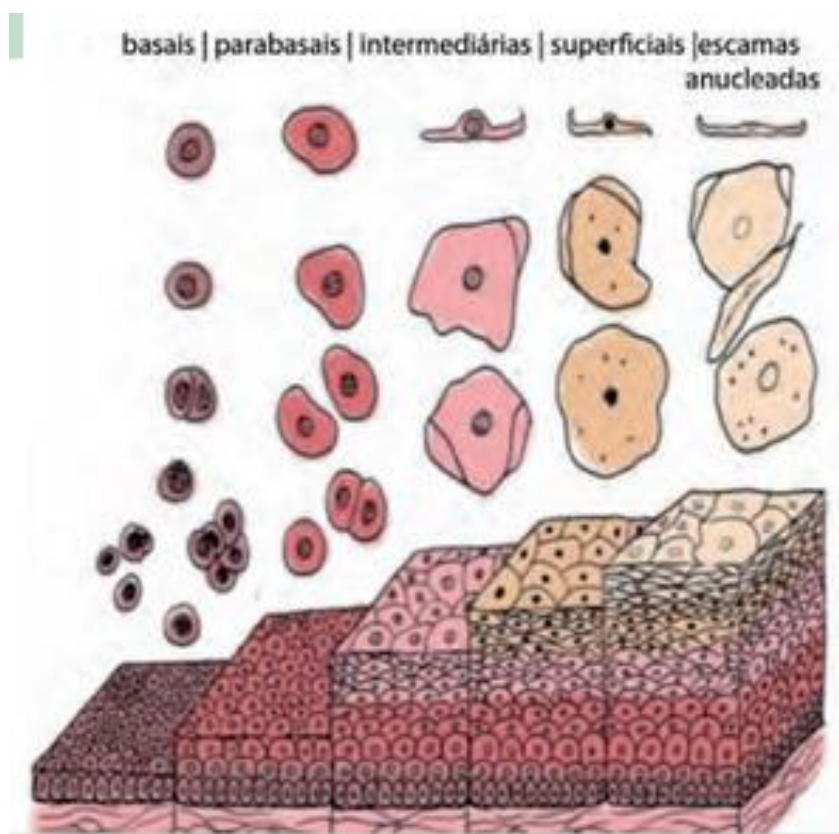
A célula basal é arredondada ou oval, apresenta citoplasma escarço, o núcleo é centralizado, redondo, com cromatina distribuída de maneira uniforme e normalmente descamam isoladamente ou apresentam-se em pequenos grumos. A camada basal, ou germinativa, é responsável, em condições fisiológicas, pela replicação celular. As outras camadas estão em diferentes estágios na maturação das células basais (LIMA, 2012).

A célula parabasal é maior que a célula basal, o núcleo apresenta-se arredondado, com o citoplasma mais abundante que as basais, e bordas bem delimitadas, sendo o citoplasma basófilo. A célula intermediária apresenta uma forma poligonal, com citoplasma

abundante e normalmente cianofílico, o seu núcleo é arredondada (MARIA-ENGLER; CONSOLARO, 2012).

As células superficiais são aproximadamente do mesmo tamanho das células intermediárias, também são poligonais, porém o citoplasma é mais aplanado e transparente, geralmente eosinofílico, e o núcleo picnótico. As células superficiais anucleadas (ou escamosas) são próximas ao tamanho das células superficiais e intermediárias, embora pareçam retraídas. A área ocupada anteriormente pelo núcleo pode aparecer como uma sombra clara (núcleo “fantasma”) e o citoplasma é eosinofílico (LIMA, 2012).

Figura 3 - Ilustração esquemática representando as diferentes camadas do epitélio escamoso, assim como os tipos de células correspondentes a cada camada.



Fonte: Lima (2012).

2.3.2. Colpocitologia

A colpocitologia, técnica introduzida por Papanicolaou em 1941, é um método utilizado para estudo do ciclo estral em diversos mamíferos. Há uma grande variedade de espécies em que a aplicação da colpocitologia é efetiva, como em: gata domestica (*Felis catus*) (CARVALHO, 2013), cadela (*Canis familiaris*) (VIERA, 2012), paca (*C. paca*)

(REIS, 2009; RIBEIRO; RUMPF; SATAPRA *et al.* 2012), cateto (*Tayassu tajacu*) (MAIA, 2011), equino (PIMENTEL; SANTOS; DIAS *et al.* 2015) e primatas não humanos, como o macaco bugio (*Alouatta caraya*) (KUGELMEIER; DEL RIO DO VALLE; DE BARROS VAZ GUIMARÃES *et al.*, 2011).

Em camundongo (*Mus musculus*), Carvalho, Paula e Carneiro (2013) e Mendonça, Evêncio-Neto e Simões (2007) realizaram coletas diárias utilizando-se de uma haste flexível com algodão umedecida com uma solução salina, fixação da lâmina com o esfregaço citológico em álcool 95% e coração com hematoxilina e eosina. Em outra técnica de coleta, Cora, Kooistra e Travlos (2015), utilizaram a técnica de lavado genital, por meio de contagotas introduzindo na cavidade vaginal solução salina, sendo 0,1 mL em camundongo e 0,2 mL para ratos (*Rattus norvegicus*). Após a lavagem, uma gota foi colocada na lâmina, a qual foi seca em temperatura ambiente e realizada coloração do tipo Romanowsky. Já no estudo de Marcondes, Bianchi e Tanno (2002), com ratos, foi utilizada uma pipeta plástica com 10 µL de solução salina (NaCl a 0,9%) para o lavado vaginal, colocação de uma gota de solução do lavado em lâmina de vidro e análise do material sem coloração. Também utilizando ratos, Barril, Grisotto e Coelho (2016), fizeram uso de 0,5 mL de solução salina, a análise ocorreu sem a coloração do material. Outra espécie em que se usou a lavagem genital foi o rabo-de-facho (*Trinomysyo nenage*) Luchesi (2010), utilizando-se uma gota (aproximadamente 50µL) de solução de cloreto de sódio a 0,9%, pipeta plástica, lâmina, a análise foi realizada sem coloração, ou quando necessário foi utilizada solução alcoólica de Azul de toluidina (5%).

Na determinação do ciclo reprodutivo de cutia (*Dasyprocta prymnolopha*), Guimarães, Moreira e Vale (1997), utilizaram uma haste flexível (8 cm) embebida em solução fisiológica para a coleta, coloração das amostras pelo método de Papanicolau. Já Santos (2012) em seu estudo com preás (*Galea spixii*), utilizou a coloração Romanowsky modificado (panótico rápido) e *swab* de algodão estéril para coleta.

De modo geral, as técnicas de colpocitologia são confiáveis, de baixo custo, e envolvem o estudo de células descamadas ou retiradas mecanicamente do epitélio vaginal. Esse epitélio é do tipo pavimentoso estratificado, apresentando várias camadas morfológicamente distintas, variando ao decorrer do ciclo estral (LUCHESE, 2010).

2.3.3. Técnicas de coloração de lâminas de citologia vaginal

Em estudos colpocitológicos, como os realizados por Marcondes, Bianchi e Tanno (2002) em ratas e por Luchesi (2010) no roedor rabo-de-facho na determinação do ciclo estral, as lâminas foram analisadas em microscopia sem a utilização de técnicas de coloração do fluido vaginal.

Entretanto, o uso de corantes facilita a identificação dos diferentes tipos celulares em lâminas de esfregaços vaginais. Uma das técnicas mais utilizadas é a proposta por Papanicolaou (PAPANICOLAOU; HERBERT, 1941). As análises de Cora, Kooistra e Travlos (2015) ressaltam características multicromática da técnica, que colore o citoplasma com tons de laranja, rosa ou azul. Dependendo do grau de cornificação, essa coloração oferece os melhores detalhes da cromatina. Para obtenção de lâminas de boa qualidade, utilizando-se a coloração de Papanicolaou, preconiza-se a fixação imediata em álcool (BORGES; CARDOSO; BOLZAN, 2012).

A técnica de coloração do tipo Romanowsky, conhecida como coloração Panótico rápido, é outro método utilizado para observação citologia vaginal, onde o material coletado normalmente seca em temperatura ambiente, e a coloração é realizada no mesmo dia (JÖRUNDSSON; LUMSDEN; JACOBS, 1999). Entretanto, na impossibilidade de proceder-se com a coloração Panótico imediatamente após a colheita, a permanência das lâminas em álcool pode ser indicada, mantendo-se bons resultados (BORGES; CARDOSO; BOLZAN, 2012). O Panótico é uma coloração policromática, caracterizada por núcleos púrpura, citoplasma azul, nucléolo azul e eritrócitos cor-de-rosa (JÖRUNDSSON; LUMSDEN; JACOBS, 1999).

Há outras técnicas de coloração que podem ser utilizadas como: Wright e Giemsa (BORGES; CARDOSO; BOLZAN, 2012; LI; SHEN, 2015); Azul de Toluidina (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015) e hematoxilina e eosina (CARVALHO; PAULA; CARNEIRO, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar o início da puberdade em cobaias (*Cavia porcellus*), por meio da observação visual da membrana de oclusão vaginal e análise de citologia vaginal.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a idade de puberdade de cobaias *short hair*;
- Avaliar a incidência e a frequência do ciclo estral em cobaias, com idades entre 15 à 60 dias de vida;
- Comparar duas técnicas de coloração, Panótico rápido e Papanicolau, para avaliação de material citológico vaginal;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Este estudo teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA – Fiocruz, sob a licença número LW-12/15 e termo aditivo P39/14.4 para a inclusão da atividade “coleta para citologia vaginal”.

O fim do experimento ocorreu quando os animais alcançaram o dia 61 de vida. Não houve modificação na rotina geral de alojamento e manejo dos animais, a não ser pelos momentos de observação da membrana de oclusão vaginal e colheita de amostras para colpocitologia.

4.2. Instalação animal e manejo

O referido estudo foi realizado SCRL/ICTB. O setor é responsável pela criação e manutenção de roedores e lagomorfos destinados à pesquisa, testes de reação à produtos químicos e testes de potência.

As instalações animais em que as cobaias foram mantidas dispunham de gaiolas de polipropileno autoclaváveis medindo 90 x 60 x 30 cm (comprimento x largura x altura). Os animais, inicialmente, permaneciam em grupos familiares com as mães, macho e filhotes de variadas idades, que ao completarem 21 dias de vida, eram desmamados seguindo as orientações do POP-SCRL-364_Rev_00 (Desmame e Sexagem de Cobaias), agrupando-as em gaiolas com seis animais. O ambiente foi mantido com temperatura entre 19° e 21°C, umidade relativa do ar entre 40 e 60 % e ciclo claro-escuro de 12:12 horas. Todos os insumos e materiais ofertados aos animais passaram por processos de descontaminação química e/ou física. Para nutrição dos animais, foi ofertada ração específica para cobaia (Quimtia®), suplementação de vitamina C (Vetec Química Fina LTDA), polivitamínico (Organnact®) e água autoclavada.

4.3. Delineamento experimental

No presente estudo, foram selecionadas 42 cobaias, com idade entre 15 à 60 dias de vida. Aos 14 dias de vida, quando estas ainda estavam alojadas com o seu grupo familiar, foram aplicados *microchip* na região dorsal escapular, seguindo as orientações do POP-

SCRL-369_Rev_00 (Implantação de *Microchip* em Cobaia), para identificação, rastreabilidade dos animais e das amostras colpocitológicas.

O início das observações da membrana vaginal deu-se quando os animais completaram 15 dias de vida. Diariamente, entre 09h00 e 10h00, os animais eram contidos fisicamente, pesados e realizada a observação da região genital, avaliando macroscopicamente a membrana de oclusão da vagina, e classificando-as em três estágios, de acordo com os critérios do Quadro 3. Entre 30 e 60 dias, a verificação da membrana foi realizada a cada dois dias e, observado o rompimento, efetuou-se a coleta citológica diariamente, até verificação do fechamento da membrana vaginal. Após fechamento da membrana, as observações retornaram à cada dois dias.

Quadro 3. Classificação do estágio da membrana de oclusão vaginal em *Cavia porcellus* no ICTB. Rio de Janeiro, 2020

Estágio da membrana	Código	Critério
Aberta	MVA	Canal vaginal com ausência da membrana
Parcialmente aberta	MVPA	Canal vaginal com abertura da membrana, mas sem espaço para introdução do <i>swab</i>
Fechada	MVF	Canal vaginal completamente coberto pela membrana

Legenda: Membrana vaginal aberta (MVA); Membrana vaginal parcialmente aberta (MVPA); Membrana vaginal fechada (MVF).

Os aspectos macroscópicos da genitália avaliados foram: coloração da vagina, presença de muco ou fluidos e inchaço da vulva. A planilha de controle de colheita da citologia vaginal foi confeccionada para o registro destes dados (APÊNDICE A – Planilha controle de colheita citologia vaginal).

4.4. Citologia vaginal

Quando a membrana de oclusão vaginal encontrava-se aberta era efetuada a coleta citológica. Na realização do esfregaço vaginal as cobaias eram contidas fisicamente para exposição da genitália, realizava-se limpeza da região genital com gaze e solução fisiológica. O material vaginal era coletado com auxílio de escova interdental cilíndrica extrafina de 3 mm de diâmetro e cerdas macias, umedecida com soro fisiológico e introduzida no canal

vaginal em, no máximo, dois terços do comprimento da região, em movimentos circulares, esfoliando suavemente a parede do canal vaginal.

Posterior à coleta citológica, realizava-se o esfregaço em duas lâminas de microscopia, que receberam identificação (ID amostra), composta por número em ordem aleatória e letra correspondente a técnica de coloração a ser utilizada (A para Panótico rápido e B para Papanicolau). As informações referentes ao animal em que se efetuou a coleta, tais como; número de *Microchip*, dia de coleta e ID ao qual recebeu foram registradas em planilha (APÊNDICE B – Controle de coleta de material vaginal). As lâminas foram armazenadas em frasco, contendo no máximo três lâminas por frasco, e direcionadas ao Laboratório de Reprodução do Serviço de Criação de Primatas não humanos (SCPRIM) do ICTB onde foram efetuadas as técnicas de coloração do presente estudo e leitura das lâminas.

As lâminas correspondentes ao grupo A, técnica de coloração Romanowsky (Panótico) com kit de coloração da marca LABORCLIN – Produtos para Laboratório LTDA. As lâminas foram coradas com intervalo máximo de 24 horas, entre a coleta e coloração, para garantir a integridade da amostra e evitar eventual contaminação da mesma. A técnica seguiu o protocolo descrito no (Quadro 4).

Quadro 4. Etapas da técnica Panótico para colocação de lâminas citológicas.

Reagente	Tempo
Triarilmetano 0,1%	10 segundos
Xantenos 0,1%	10 segundos
Tiazinas 0,1%	20 segundos

Fonte: Manual do fabricante, 2018.

As lâminas do grupo B (Papanicolau), os corantes utilizados para realização dessa técnica foram adquiridos separadamente ou preparados no Scprim/ICTB. As lâminas foram armazenadas em frascos plásticos para lâminas, contendo no máximo três lâminas por frasco, contendo solução de álcool 90% para fixação. Posteriormente, a coloração foi realizada no Laboratório de Reprodução do SCPRIM/ICTB, seguindo as etapas descritas no Quadro 5.

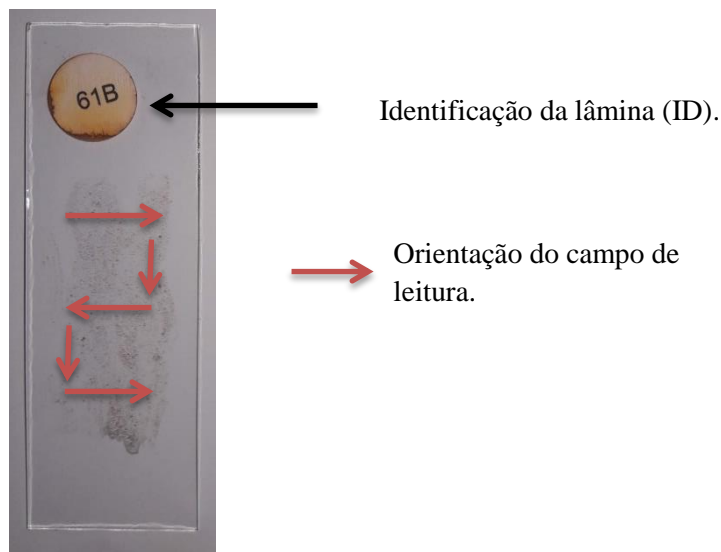
Quadro 5. Etapas da técnica Papanicolau para a coloração de lâminas citológicas.

Reagentes	Tempo
Álcool a 80%	10 passagens
Álcool a 70%	10 passagens
Álcool a 50 %	10 passagens
Água destilada	1 minuto
Hematoxilina de Harris	6 minutos
Água destilada	7 passagens
Água (200 mL) – Ácido clorídrico (2 gotas)	3 passagens
Água corrente	1 minuto
Álcool a 50 %	10 passagens
Álcool a 70%	10 passagens
Álcool a 80%	10 passagens
Álcool a 95%	10 passagens
Alaranjado 6	3 minutos
Álcool a 95%	10 passagens
Eosina	2 minutos
Álcool a 95%	10 passagens
Álcool a 95%	10 passagens
Álcool a 100%	10 passagens
Álcool a 100 %	10 passagens
Xilol	10 passagens

Fonte: Kugelmeier, 2005.

Para a leitura, as lâminas constavam apenas com número de ID, garantindo a leituras a cegas. A mesma foi realizada em microscopia óptica, campo claro, com aumento de 100 e 400 vezes. O campo de leitura foi determinado pela disposição e quantidade de material presente na lâmina, preferencialmente evitando as extremidades e campos com grumos, onde fosse possível diferenciar os tipos celulares no esfregaço vaginal (Figura 4).

Figura 4. Esquema para orientação do campo de leitura das lâminas de esfregaço citológico vaginal, de forma a percorrer toda a lâmina, escolhendo os melhores campos e evitando aqueles onde não foi possível diferenciar os tipos celulares. Rio de Janeiro, 2020



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

As lâminas foram avaliadas de maneira quantitativa e qualitativa. Na avaliação quantitativa considerou a contagem dos tipos celulares em números absolutos, totalizando 200 células. Após a contagem, foi calculada a porcentagem dos tipos celulares do epitélio vaginal encontrados em cada amostra. Seguindo a classificação utilizada por Guimarães e colaboradores (1997), os tipos celulares foram classificados em células: basal, parabasal, intermediária, superficial nucleada e superficial anucleada. Na avaliação qualitativa observou-se a presença de: muco, leucócitos, fungos, bactérias, a limpeza e a quantidade de material na lâmina. A presença de cada achado foi qualificada seguindo os critérios descritos no Quadro 6 e, em seguida, registradas em planilha (APÊNDICE C – Planilha de coleta de amostras de material vaginal). Construção desenho experimental *software* EDA (NC3Rs®), diagrama (APÊNDICE D – Diagrama desenho experimental EDA).

Quadro 6. Descrição dos critérios da avaliação qualitativa das lâminas com esfregaços citológicos vaginais de cobaia (*Cavia porcellus*). Rio de Janeiro, 2020

Classificação	Código	Descrição
Ausente	-	Não é observado durante a leitura da lâmina
Leve	+	Observado em poucos campos de leitura da lâmina
Moderado	++	Observado em alguns campos de leitura da lâmina
Elevado	+++	Observado por todos os campos de leitura da lâmina

4.5. Análise dos resultados

Os dados obtidos foram registrados em fichas de exame individuais e sistematizados em planilhas do Excel, conforme descrito anteriormente.

Para a descrição dos resultados, foram observadas a abertura da membrana de oclusão vaginal de cada fêmea, a idade, o tempo de permanência e a fase do ciclo em que ocorreu a abertura. Nos dados da citologia vaginal foi realizada estatística descritiva, cálculos de média e desvio padrão, erro padrão e variação dos dados originais. Para comparação entre as diferenças nas técnicas de coloração utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA), e o mesmo teste analítico foi realizado para comparar o número de tipos celulares presentes nos três ciclos observados e o Teste T para comparação entre as médias obtidas nos primeiro e segundo ciclos por meio do *software* livre Bioestat versão 5.0.

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05.

5. RESULTADOS

Os resultados encontram-se divididos nos seguintes tópicos:

- Avaliação dos ciclos estrais entre os 15 e 60 dias de vida;
- Puberdade antes de 21 dias de vida;
- Comparação das técnicas de coloração Panótico rápido;

5.1. Avaliação dos ciclos estrais entre 15 e 60 dias de vida

A avaliação macroscópica da membrana de oclusão vaginal foi efetuada em todos os 42 animais do estudo, totalizando 1274 verificações. Evidenciou-se que, em 73% das avaliações da vulva, o *status* encontrado era o de membrana vaginal fechada (MVF), em 13% encontrou-se o *status* de membrana vaginal parcialmente aberta (MVPA), enquanto que a membrana vaginal aberta (MVA) foi relatada em 14% das observações da região genital das cobaias.

Na avaliação macroscópica da vulva de *C. porcellus* com idade entre 15 e 60 dias de vida, verificou-se que a membrana vaginal fechada (MVF) é caracterizada quando não se observa o acesso ao canal vaginal (Figura 5-A). Na Figura 5-B pode-se observar o inchaço da vulva e uma secreção incolor deixando-a com aspecto de úmida em toda a região genital. Salienta-se que no *status* membrana vaginal parcialmente aberta (MVPA), não houve a ausência completa da MV, que ainda se faz presente nas regiões mais próximas aos lábios (Figura 5-C). O *status* membrana vaginal aberta (MVA) caracterizou-se pela ausência total da membrana de oclusão vaginal permitindo, assim, acessar o canal vaginal (Figura 5-D).

Figura 5. Análise macroscópica da membrana de oclusão vaginal de *Cavia porcellus* com idade entre 15 e 60 dias de vida, do ICTB/Fiocruz. Membrana vaginal fechada (MVF) (A); Inchaço vulva e secreção

(B); Membrana vaginal parcialmente aberta (MVPA) (C); Membrana vaginal aberta (MVA) (D), rompimento da membrana de oclusão vaginal. Rio de Janeiro, 2020.



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Para fêmeas utilizadas nesse estudo, entre 15 e 60 dias de vida, o rompimento da membrana de oclusão vaginal ocorreu, ao menos uma vez, em 39 das 42 fêmeas (92,85 %) avaliadas. Do total de fêmeas com membrana vaginal aberta (MVA), 23 (58,97 %) apresentaram uma segunda abertura, com intervalo entre as aberturas de sete à 21 dias. Observou-se que seis fêmeas (15,38 %) apresentaram uma terceira abertura, com intervalos entre 15 à 18 dias (Tabela 1). A duração do intervalo da abertura da membrana vaginal (AMV) foi calculada a partir do primeiro dia de abertura da MV até o dia anterior a próxima abertura. Dessa maneira, a duração do intervalo da AMV nesse estudo variou entre 7 e 21 dias, a maior frequência com duração entre 17 e 18 dias, os quais, totalizaram 44,81 % dos intervalos constatados, (Tabela 2).

Tabela 1. Observação das aberturas da membrana vaginal (AMV) de *Cavia porcellus* do ICTB/Fiocruz, quantitativo de fêmeas, média e desvio padrão, da idade em que a AMV foi constatada e da duração, além do intervalo entre as aberturas. Rio de Janeiro, 2020.

AMV	Fêmeas (n)	Idade média e desvio padrão (dias)	Duração média e desvio padrão (dias)	Intervalo entre AMV (dias)
1º	39	35±9,75	3±2	-
2º	23	48±7,91	2±1,33	7 – 21
3º	6	53±4,88	2±0,81	15 - 18

Tabela 2. Duração, frequência e proporção do total de intervalo de AMV avaliados em *Cavia porcellus*, entre 15 e 60 dias de vida, no ICTB/Fiocruz, com destaque para os intervalos de duração mais frequentes. Rio de Janeiro, 2020.

Intervalo de AMV (dias)	Frequência do total de ciclos avaliados	Porcentagem (%)
7	2	6,89%
13	1	3,44%
15	4	13,79%
16	4	13,79%
17	7	24,13%
18	6	20,68%
19	3	10,34%
21	2	6,89%

Quando observado o tempo de permanência da abertura MV, notou-se uma variação de 1 à 12 dias ininterrupta, com maior frequência para uma duração de dois dias, representando 32% do total de MVA. Ressalta-se que 72% dos ciclos observados apresentaram variação de 1 à 3 dias de MVA, os dados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Tempo de permanência da abertura da membrana vaginal em *Cavia porcellus* com 15 a 60 dias de idade no ICTB/Fiocruz, com destaque para as durações mais frequentes. Rio de Janeiro, 2020

Tempo de abertura em cada ciclo (dias)	Ciclos observados (n)	Porcentagem (%)
1	9	18%
2	16	32%
3	11	22%
4	6	12%
5	2	4%
7	1	2%
8	1	2%
12	1	2%

Constatou-se que 38 fêmeas apresentaram, ao menos em um dos ciclos, membrana vaginal parcialmente aberta (MVPA) anterior ou posterior ao rompimento da MV. A MVPA, anterior ao rompimento da MV, em 72% dos ciclos não foi observada. Quando observada a MVPA (dias antes da MVA), esta variou de 1 à 8 dias, com maior frequência ocorrendo em 1 dia, representando 12% do total de MVPA. Salienta-se que, em um dos ciclos, a MVPA permaneceu por 8 dias, sendo o período mais longo observado. Registra-se que, após o rompimento da MV, a MVPA variou de 1 à 5 dias, com maior frequência ocorrendo em 1 dia, o que representa 55% do total de MVPA (dias após MVA). Em 11 ciclos a MVPA não foi observada, representando 16% (Tabela 4).

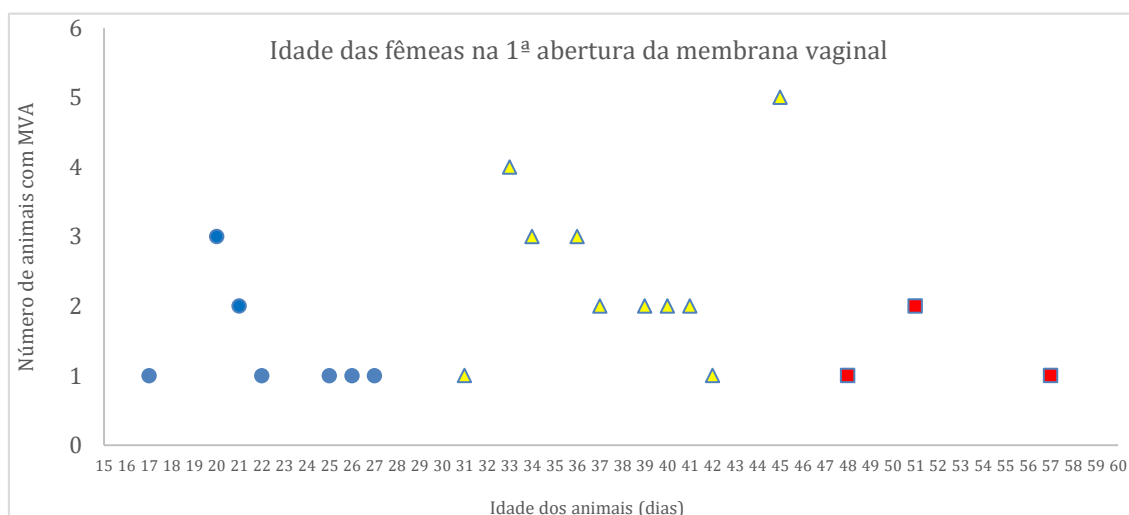
Tabela 4. Frequência da observação de membrana vaginal parcialmente aberta, dias antes e dias após a membrana vaginal aberta em *Cavia porcellus* com idade entre 15 e 60 dias de vida no ICTB/ Fiocruz, Rio de Janeiro, 2020.

MVPA (dias antes MVA)	Nº de Ciclos observados	%	MVPA (dias após MVA)	Nº de ciclos observados	%
0	49	72%	0	11	16%
1	8	12%	1	37	55%
2	4	6%	2	7	10%
3	3	5%	3	9	13%
4	2	3%	4	2	3%
5	1	1%	5	2	3%
8	1	1%	-	-	-

5.1.1. Abertura da membrana de oclusão vaginal, 1ª abertura.

Observou-se que na primeira ocorrência de MVA há uma variação de idade entre 17 e 57 dias. Não foi observada uma maior frequência na idade das fêmeas na primeira ocorrência de MVA, ocorrendo uma distribuição por todo o período de observação dos animais. Salienta-se que 10 das 39 fêmeas apresentaram 1ª abertura da MV com idade entre 15 e 30 dias de vida, com idade média de $21,9 \pm 2,98$ dias, já com idade entre 31 e 45 dias de vida, 25 fêmeas apresentaram AMV, com idade média de $38,04 \pm 4,53$ dias e entre 46 e 60 dias de vida, observou-se 4 fêmeas, com média de $51,75 \pm 3,26$ dias. Os dados podem ser observados na Figura 6.

Figura 6. Distribuição da idade na primeira abertura da membrana vaginal de *Cavia porcellus* entre 15 e 60 dias de vida. ICTB/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2020.



Legenda. Intervalo entre 15 e 30 dias de vida (●); Intervalo entre 31 e 45 dias de vida (▲); Intervalo entre 46 e 60 dias de vida (■).

O tempo de permanência da abertura da MV variou de 1 à 12 dias ininterruptos na 1ª abertura, com maior frequência entre 1 e 3 dias, representando 75% do total MVA na primeira abertura. Salienta-se uma fêmea que apresentou primeira AMV com 41 dias de vida e permaneceu por 12 dias ininterruptos (Tabela 5).

Tabela 5. Duração em dias da 1ª abertura da membrana vaginal (MV) de *Cavia porcellus* entre 15 e 60 dias de vida no ICTB/Fiocruz, com destaque para as durações mais frequentes. Rio de Janeiro, 2020.

Duração da 1ª abertura da MV (dias)	Nº de fêmeas	Porcentagem
1	9	23%
2	10	26%
3	10	26%
4	6	15%
5	2	5%
8	1	2,5%
12	1	2,5%

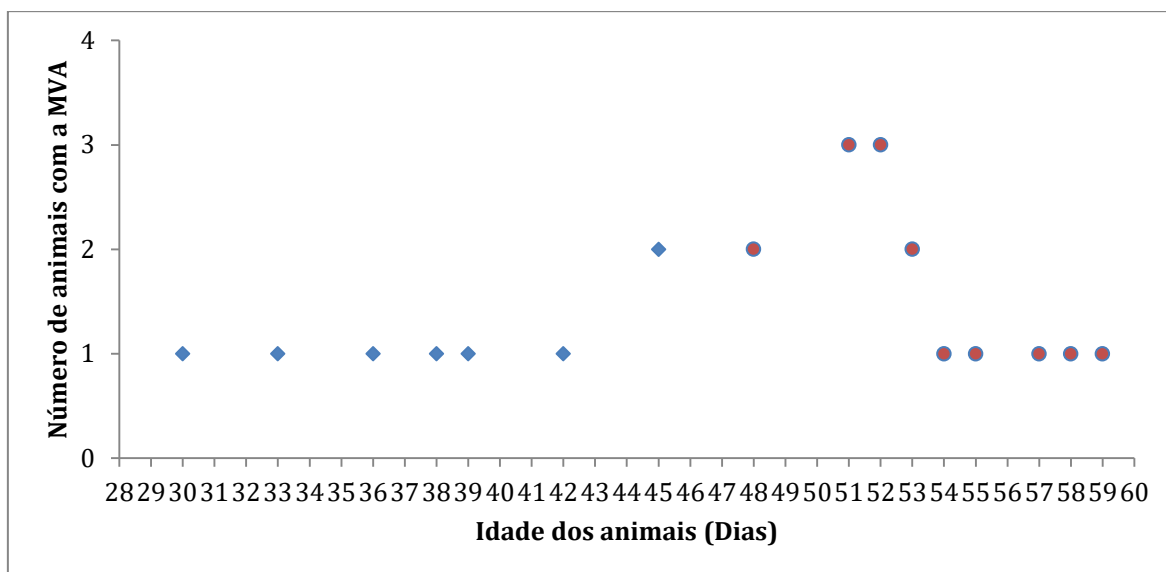
5.1.2. Abertura da membrana de oclusão vaginal, 2ª abertura.

Verificou-se que 23 fêmeas apresentaram segunda ocorrência de MVA, distribuídas entre 30 e 59 dias de idade. Não foi observada uma frequência na idade das fêmeas na segunda ocorrência de MVA, ocorrendo uma distribuição por quase todo o período de observação dos animais (Figura 7). Observou-se que 8 das 23 fêmeas apresentaram 2ª abertura da MV em um intervalo de idade entre 30 e 45 dias de vida, com média de $38,5 \pm 5$ dias, já com intervalo entre 46 e 60 dias de vida, 15 fêmeas apresentaram AMV, com idade média de $52,9 \pm 3,1$ dias. O tempo de permanência da abertura da MV variou de 1 a 7 dias ininterruptos, com maior frequência entre 1 e 3 dias, representando 87% do total MVA na segunda abertura (Tabela 6).

Tabela 6. Duração em dias da 2ª abertura da membrana vaginal (MV) de *Cavia porcellus* entre 15 e 60 dias de vida, no ICTB/Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020.

Duração da 2ª abertura da MV (dias)	Nº de fêmeas	Porcentagem
1	6	26%
2	9	39%
3	5	22%
4	2	9%
7	1	4%

Figura 7. Distribuição da idade à segunda abertura da membrana vaginal de *Cavia porcellus* (30 e 59 dias de vida) no ICTB/ Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020.

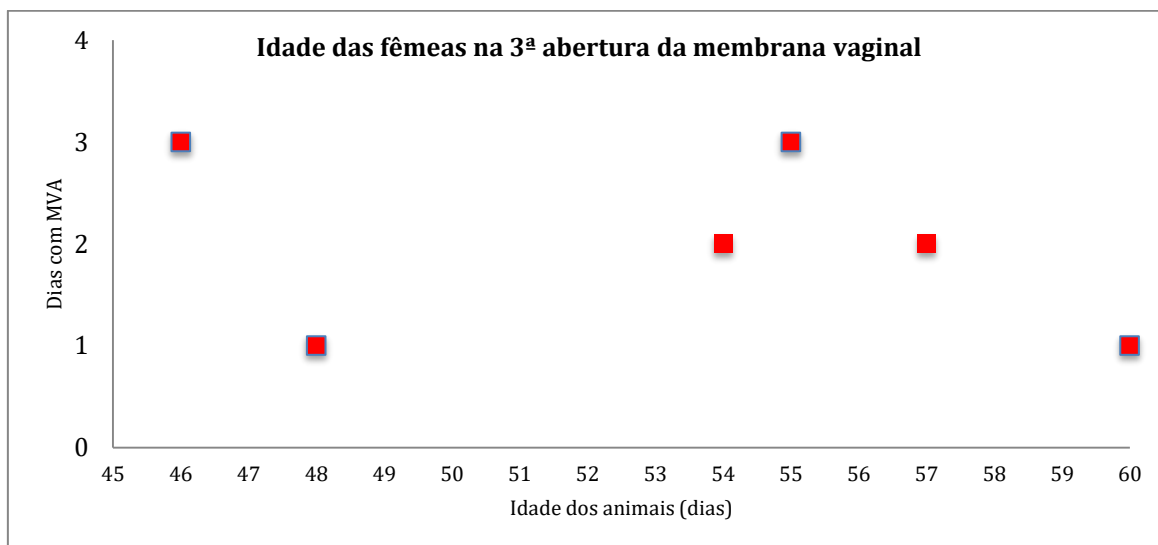


Legenda. Intervalo entre 30 e 45 dias de vida (), Intervalo entre 46 e 60 dias de vida ().

5.1.3. Abertura da membrana de oclusão vaginal, 3ª abertura.

A 3ª abertura de membrana de oclusão vaginal foi observada em idades distribuídas entre 46 e 60 dias, com média de $53,3 \pm 4,88$ dias. Não foi observada maior frequência em alguma idade das fêmeas na terceira ocorrência de MVA, mostrando uma distribuição por quase todo o período de observação dos animais. O tempo de permanência e frequência da abertura da MV variou de 1 à 3 dias ininterruptos. Pontua-se que esse grupo corresponde à 21,74 % das fêmeas que apresentaram segunda abertura MV (Figura 8).

Figura 8. Distribuição da idade à terceira abertura da membrana vaginal de *Cavia porcellus* (46 e 60 dias de vida) no ICTB/ Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020.



5.1.4. Citologia esfoliativa vaginal de *Cavia porcellus*

A coleta citológica foi realizada, ao menos uma vez, em 39 de 42 fêmeas acompanhadas no presente estudo, foram confeccionadas e avaliadas um total de 331 lâminas (somadas as lâminas com as colorações Panótico e Papanicolau) quanto à presença dos tipos celulares do epitélio vaginal de cobaias. Para a análise da distribuição das células levou-se em consideração as lâminas coradas com a técnica de Panótico rápido. Percebeu-se uma diferença na distribuição, onde células superficiais nucleadas e anucleadas foram encontradas em todas as lâminas analisadas e em menos da metade das lâminas analisadas observou-se células basais (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição da presença dos tipos celulares na observação das lâminas microscópicas do epitélio vaginal de cobaias (*Cavia porcellus*) com idade entre 15 e 60 dias de vida, avaliadas nesse estudo. Rio de Janeiro, 2020.

Tipos celulares	Distribuição nas lâminas	
	Presença	Porcentagem
Basal	142	42,9
Parabasal	292	88,21
Intermediária	329	99,39
Superficial	331	100
Total de lâminas	331	

Observando a distribuição média e o desvio padrão entre o perfil dos tipos celulares na caracterização das fases do ciclo estral em cobaias, notou-se que no proestro, as células intermediárias apresentaram maior número, $99 \pm 27,3$ do total de células contadas, e presença leve (+) de muco e leucócitos. No estro as células superficiais foram predominantes, sendo anucleadas em maior média ($113 \pm 32,8$), além da ausência de leucócitos e muco. No metastro, as células intermediárias eram maioria, correspondendo a cerca 95 ± 26 células, os leucócitos se apresentaram de quantidade moderada (++) e o muco era ausente. Ressalta-se que no diestro, levou-se em consideração a análise de lâminas coletadas a partir do quinto dia de abertura da MV. Nessa fase observou-se uma distribuição mais uniforme entre as células superficiais nucleadas, anucleadas e intermediárias e um número bastante elevado de leucócitos (+++). Chamou atenção ainda o aumento do número de células parabasais tanto no metaestro quanto no diestro, quando comparado as quantidades observadas nas demais fases. Não houve diferença estatística na quantidade contabilizada de cada tipo celular entre as diferentes fases do ciclo estral ($P < 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição média e desvio padrão entre o perfil dos tipos celulares na caracterização das fases estral em cobaias (*Cavia porcellus*) estudadas no ICTB / Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020.

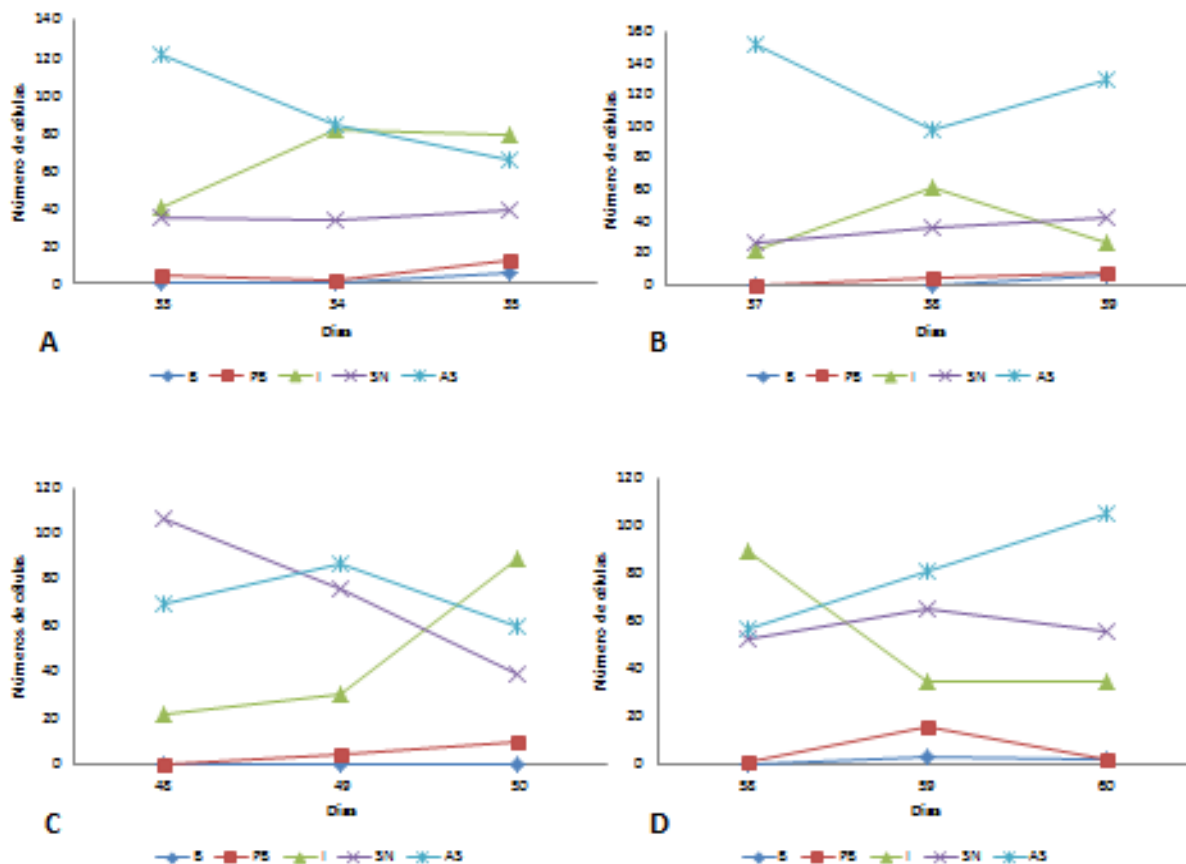
Tipos celulares	Fases do ciclo estral			
	Proestro (N=27)	Estro (N=50)	Metaestro (N=31)	Diestro* (N=21)
Superficial anucleada	55 ± 22,9	113 ± 32,8	47 ± 24,2	62 ± 17,4
Superficial nucleada	36 ± 19,4	55 ± 24,9	37 ± 17,6	41 ± 17,5
Intermediária	99 ± 27,3	26 ± 16,2	95 ± 26,0	73 ± 22,9
Parabasal	8 ± 11,0	4 ± 6,7	16 ± 13,3	20 ± 12,9
Basal	1 ± 1,9	1 ± 3,6	4 ± 5,3	3 ± 4,9
Leucócitos	+	-	++	+++
Muco	+	-	-	-

Legenda: Leve (+); Moderado (++); Elevado (+++) e ausente (-); Número de lâminas (N). * levou-se em consideração a análise de lâminas coletadas a partir do quinto dia de abertura da MV.

Em todo o estudo, um total de 50 lâminas de 23 fêmeas, apresentaram distribuição dos tipos celulares característicos à fase de estro em *Cavia porcellus*. Dentre estas 23 fêmeas, aponta-se quatro para ilustrar as mudanças de tipos celulares em dias consecutivos de avaliação citológica.

Na leitura das lâminas, observou-se uma variação na distribuição dos tipos celulares nos dias subsequentes de análise. As células superficiais anucleadas e intermediárias apresentaram maior variação entre a primeira e terceira lâminas analisadas, a distribuição dos tipos celulares condizentes com a fase do estro é observado na primeira leitura (Figura 9-A e 9-B). As células parabasal e basal apresentam-se em baixas quantidades e a sua distribuição sofrem poucas variações, as células intermediárias, assim como as superficiais anucleadas, sofrem as maiores variações ao longo das análises das lâminas. O estro foi caracterizado, com distribuição dos tipos celulares característico, no primeiro dia de coleta, assim como no terceiro (Figura 9-C e 9-D).

Figura 9. Distribuição dos tipos celulares do epitélio vaginal, durante fase de MVA de quatro cobaias com idade entre 33 e 60 dias de vida, do ICTB/ Fiocruz. Tipos celulares; Basal (B); Parabasal (PB); Intermediária (I); Superficial nucleada (SN) e Superficial anucleada (AS). Rio de Janeiro, 2020.

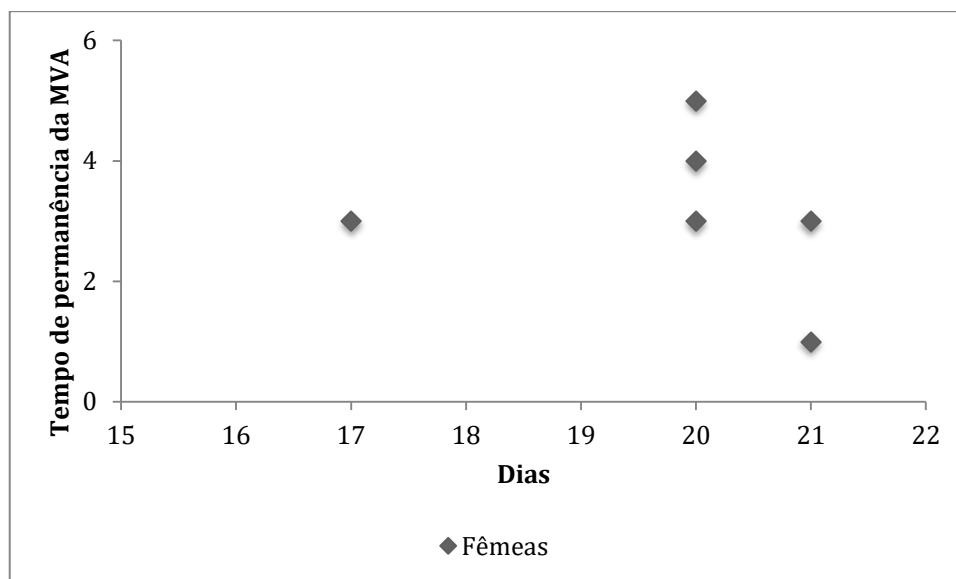


Legenda: A – Fêmea 20670; B – Fêmea 20678; C – Fêmea 20688 e D – Fêmea 20705.

5.2. Puberdade antes de 21 dias de vida.

Das 39 fêmeas que apresentaram abertura da membrana de oclusão vaginal, seis tinham idade inferior a 21 dias de vida, correspondendo a 15,38 % das fêmeas na primeira abertura da membrana. O tempo de permanência da MVA variou de 1 a 5 dias, com idade dos animais variando entre 17 e 21 dias de vida, as fêmeas com 20 dias de vida apresentaram maior frequência, correspondendo a 50 % das observações (Figura 10).

Figura 10. Distribuição da idade na primeira abertura da membrana vaginal e tempo de permanência da MVA em *Cavia porcellus* com idade inferior a 21 dias de vida. ICTB/FIORUZ. Rio de Janeiro, 2020.



Quanto à correlação entre peso e idade das fêmeas ao primeiro cio, observou-se que o peso médio das seis fêmeas que apresentaram estro precoce (até 21 dias de vida) foi de $299 \pm 45,42\text{g}$, enquanto que o peso médio das 33 fêmeas que apresentaram estro após os 21 dias de vida foi de $264 \pm 32,03\text{g}$ à idade de 20 dias, havendo então uma diferença significativa ($p=0,02$) entre as médias dos pesos das fêmeas que tiveram cio precoce e as que tiveram acima de 21 dias de vida (Figura 11).

Foi observada a distribuição das células superficiais totais, em animais com idade inferior a 21 dias de vida. Com destaque para uma análise citológica, onde a fêmea apresentou contagem superior a 140 células superficiais totais, um critério para definição de estro. Notou-se que em outras duas análises as células superficiais não passaram de 60 células. Verificou-se que as demais análises, as células superficiais ficaram na faixa entre 65 e 120 células (Figura 12). Salienta-se que em uma das fêmeas, a lâmina analisada apresentou baixa qualidade, como elevada concentração de muco e formação de grumos, impossibilitando a diferenciação e contagem dos tipos celulares.

Figura 11. Médias de peso das fêmeas que apresentaram estro precoce (A) e fêmeas que apresentaram estro após 21 dias (B) de vida no ICTB/ Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020.

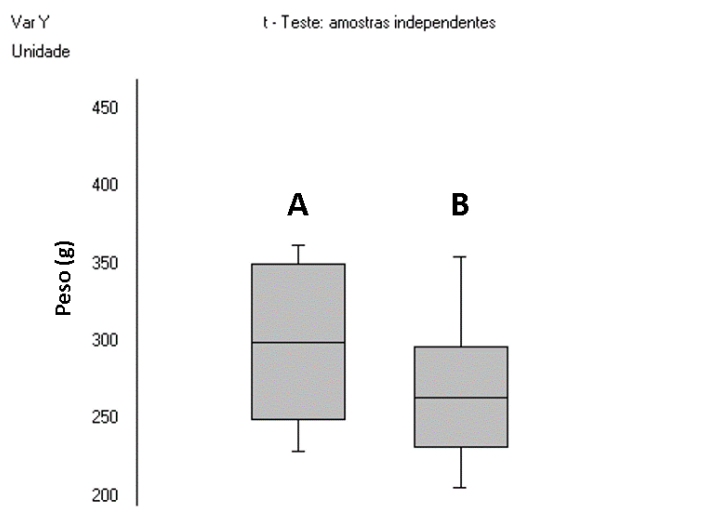
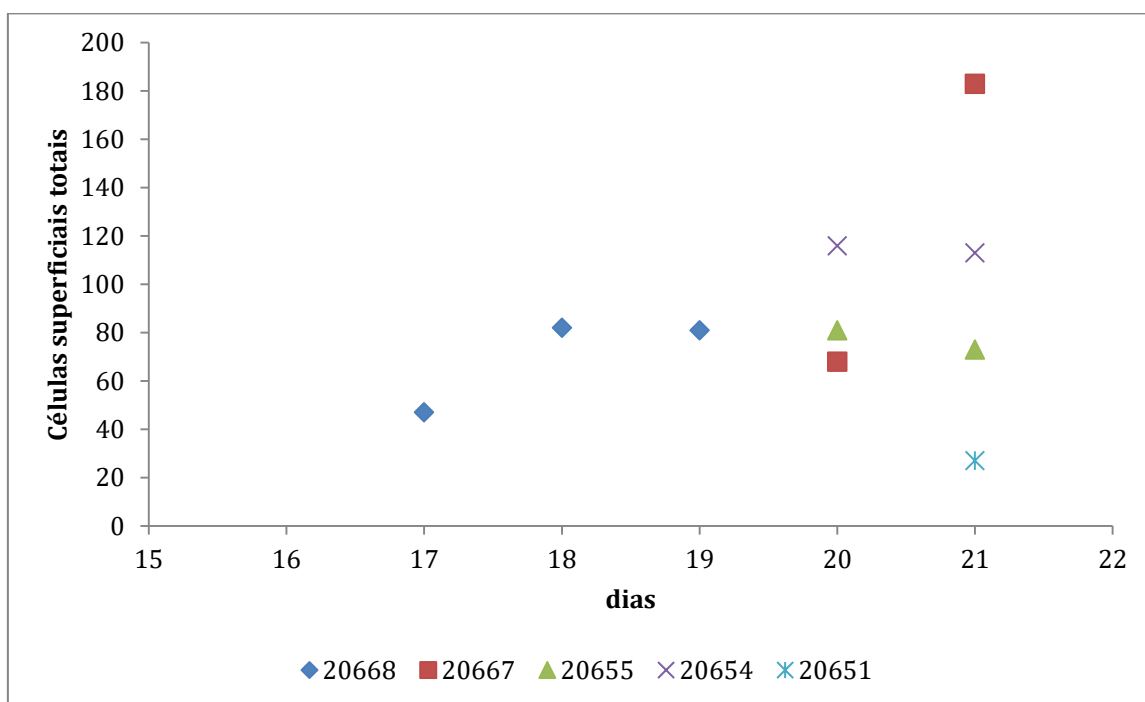
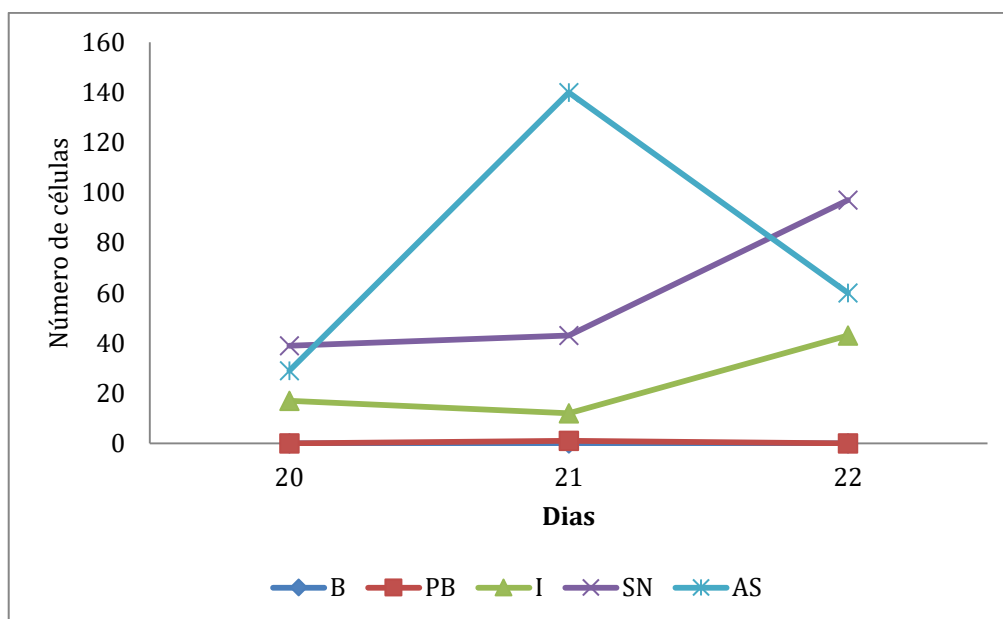


Figura 12. Distribuição de células superficiais totais de cobaias com idade inferior a 21 dias de vida no ICTB/ Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020.



Evidenciou-se um animal com 21 dias de vida em que a distribuição dos tipos celulares do epitélio vaginal apresentou células superficiais totais (somando células nucleadas e superficiais anucleadas) com contagem igual ou superior a 140 células, além de baixa presença de células intermediárias, parabasais e basais, um dos critérios para caracterização da fase do estro. Observou-se uma mudança na distribuição dos tipos celulares nos dias subsequentes de análise. Na primeira coleta em fêmea com 20 dias de vida, não foi contabilizado um total de 200 células, apresentando células superficiais em maior número. No segundo dia de coleta, em uma fêmea com 21 dias ocorreu aumento das células superficiais totais, ultrapassando de 140 células, e ocorreu uma baixa no quantitativo de células intermediárias e manutenção das células parabasais e basais. Na coleta aos 22 dias, percebeu-se uma queda no número de células superficiais anucleadas e crescimento exponencial no número de células superficiais nucleadas e intermediárias (Figura 13).

Figura 13. Distribuição dos tipos celulares do epitélio vaginal da cobaia 20667 com idade entre 20 e 22 dias de vida avaliado no estudo. Tipos celulares; Basal (B); Parabasal (PB); Intermediária (I); Superficial nucleada (SN) e Superficial anucleada (AS).



5.3. Comparação das técnicas de coloração Panótico rápido e Papanicolau

Observando-se uma distribuição média dos tipos celulares nas lâminas de esfregaço vaginal, verificou-se que as células superficiais anucleadas apresentaram distribuição entre 76 e 74 células por lâmina, as células intermediárias tiveram média entre 62 e 68 células, já as células superficiais nucleadas apresentaram média entre 43 e 44 células. Os tipos celulares

que apresentaram menor média foram as células parabasais 12 e 11 células e as células basais 3 e 2 células (Figura 14). Após agrupar todos os dados de leitura das lâminas, com caracterização de estro, observou distribuição média e desvio padrão dos tipos celulares e não foi identificada diferença significativa ($P > 0.05$) na distribuição dos tipos celulares do epitélio vaginal entre a técnica de coloração Panótico e a técnica de coloração Papanicolau (Tabela 9).

Figura 14. Distribuição média de células epiteliais vaginais em *Cavia porcellus*, com idade de 17 a 60 dias, classificadas como basal (B), parabasal (PB), intermediária (I), superficial nucleada (SN) e superficial anucleada (AS) utilizando a técnica de coloração Panótico e Papanicolau. Rio de Janeiro, 2020

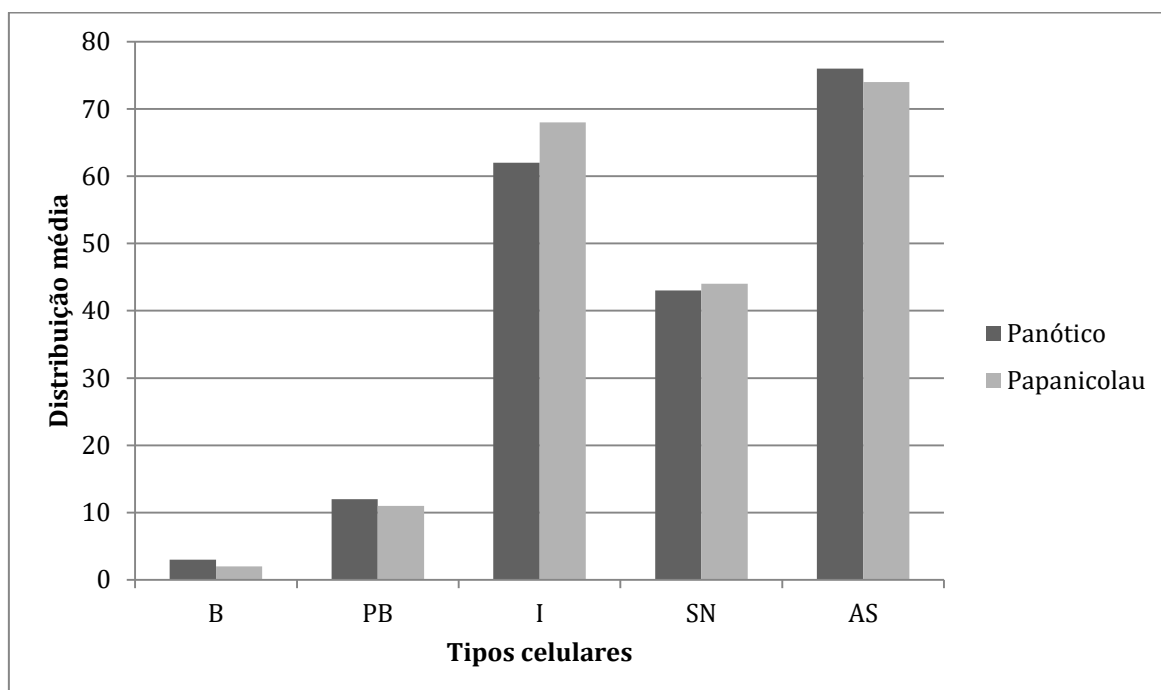


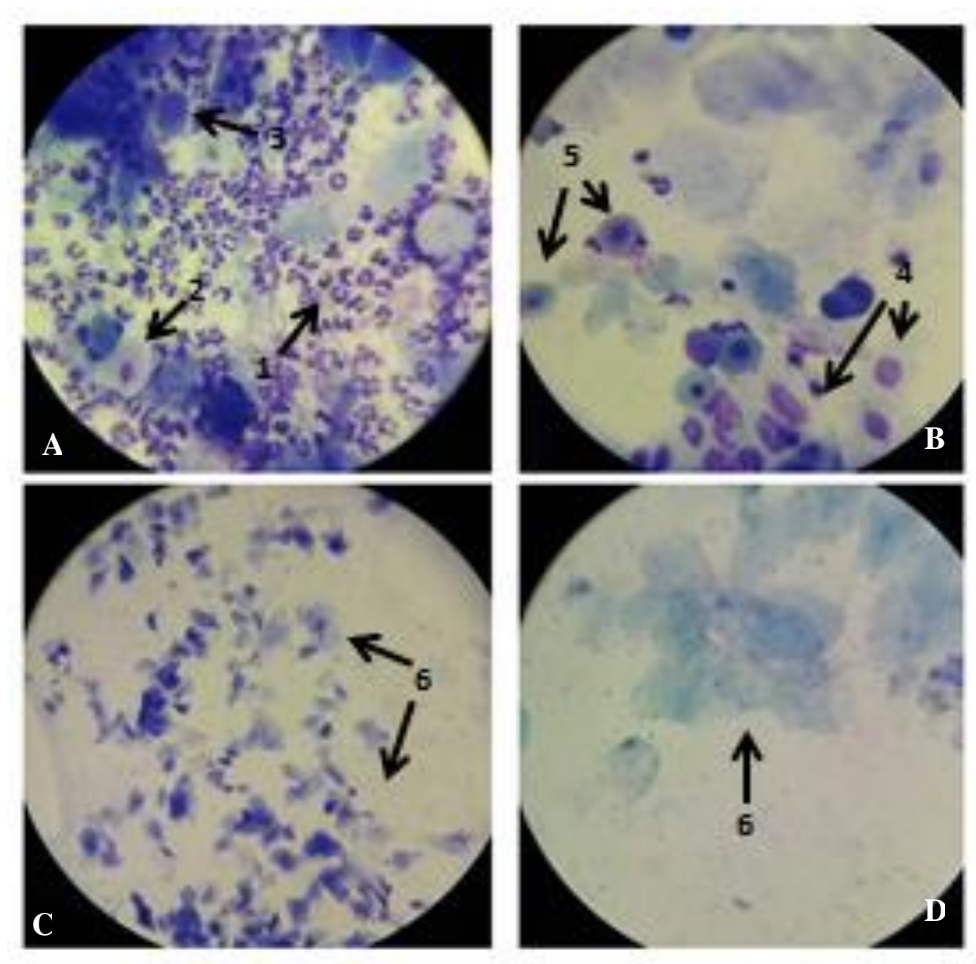
Tabela 9. Distribuição média e desvio padrão dos tipos celulares na caracterização do estro, realizadas com as técnicas de coloração Panótico e Papanicolau, em cobaias (*Cavia porcellus*) estudadas no ICTB/ Fonte: Fiocruz. Rio de Janeiro, 2020

Tipos celulares	Caracterização do estro	
	Panótico	Papanicolau
Superficial Anucleada	112,64 ± 32,85	111,04 ± 33,49
Superficial Nucleada	54,78 ± 24,95	55,16 ± 27,35
Intermediária	25,62 ± 16,17	27,74 ± 15,65
Parabasal	4,42 ± 6,73	4,56 ± 7,72
Basal	1,44 ± 3,26	1,04 ± 2,52

Na análise microscópica, visualizou-se todos os tipos celulares do epitélio vaginal de cobaias, alterando a sua distribuição ao longo das análises. À coloração Panótico observou-se elevada concentração de leucócitos apresentando núcleo de coloração púrpura (Figura 15-

A-1), células superficiais nucleadas com citoplasma roxo claro e núcleo cinza (Figura 15-A-2), e aglomerado de células sem definição do tipo (Figura 15-A-3). Também foram observadas células intermediárias com núcleo púrpura com vacúolos, formato oval e citoplasma roxo claro (Figura 15-B-4) e célula parabasal com núcleo centralizado roxo e citoplasma arredondado roxo claro (Figura 15-B-5). Destacaram-se ainda agrupamentos de células superficiais anucleadas com citoplasma roxo escuro e extremidades dobradas (Figura 15-C-6), agrupamento de células superficiais anucleadas com citoplasma azul (Figura 15-D-6), e células superficiais anucleadas com citoplasma roxo claro e núcleo cinza (Figura 15-D-6), características da fase estro

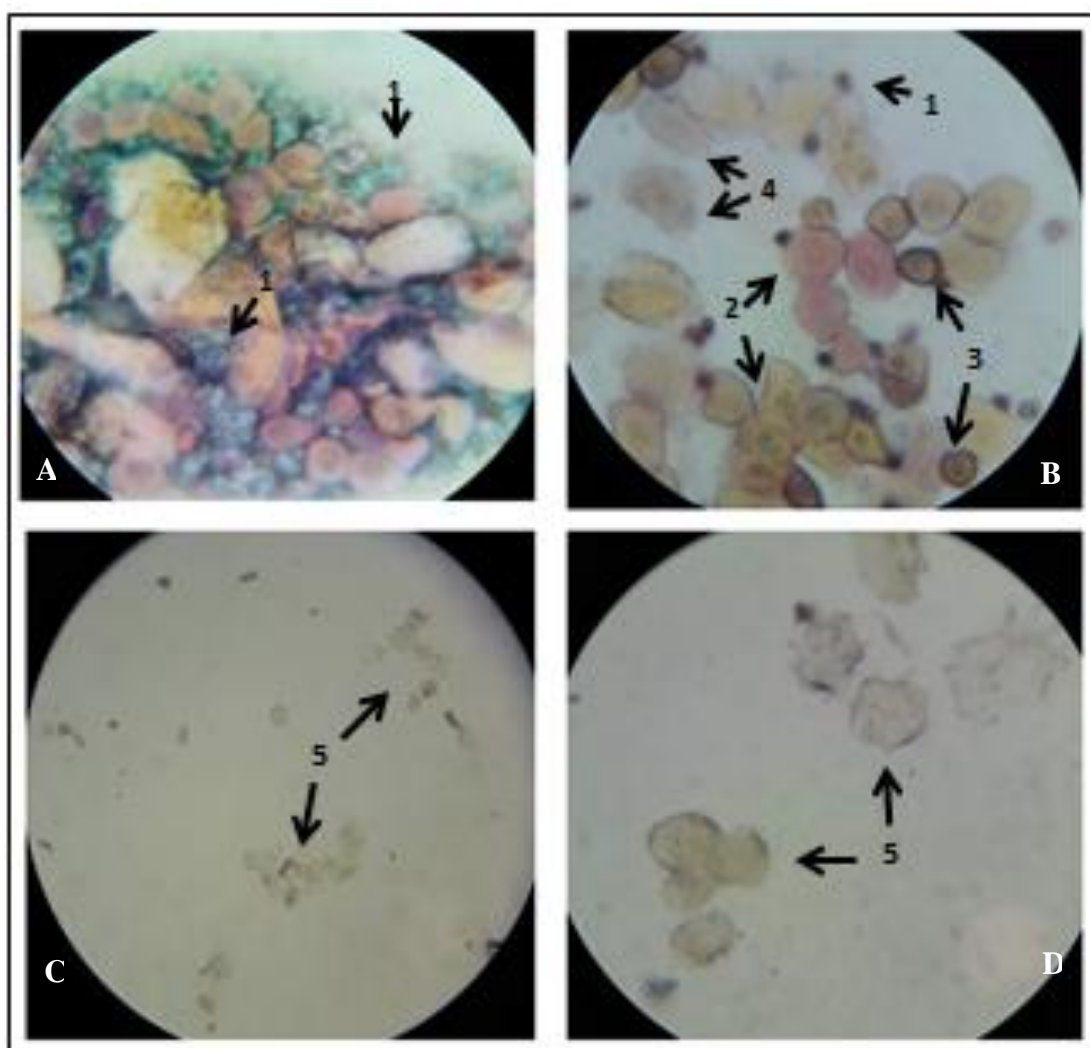
Figura 15. Microscopia ótica do esfregaço vaginal de cobaia, usando coloração Panótico. (A) Leucócito (1), célula superficial nucleada (2) e células sem definição (3); 100x. (B) célula intermediária (4) e célula parabasal (5); 400x. (C) estro, célula superficial anucleada (6) 100x; (D) célula superficial anucleada (6) e célula nucleada (2); 400x.



À coloração Papanicolau (Figura 16) observou-se concentração de leucócitos apresentando núcleo de coloração cinza, com citoplasma verde metálico (Figura 16-A-1). Destacaram-se também células intermediárias com núcleo cinza e citoplasma que se

apresentaram em diferentes tonalidades, amarelo, amarelo claro e rosa (Figura 16-B-2), célula parabasal apresentando núcleo cinza e citoplasma amarelo escuro, com a membrana celular preta (Figura 16-B-3) e célula superficial nucleada com núcleo cinza claro e citoplasma amarelo claro (Figura 16-B-4). Também foi possível observar células superficiais anucleadas com citoplasma amarelo e amarelo claro (Figuras 16-C e D-5), características da fase do estro em cobaias.

Figura 16. Microscopia ótica do esfregaço vaginal de cobaia, usando coloração Papanicolau. (A) Leucócito (1); (B) célula intermediária (2), célula parabasal (3) e célula superficial nucleada (4); 400x; (C) e (D) estro, célula superficial anucleada (5), 100x e 400x.



6. DISCUSSÃO

A partir do estudo realizado, foi possível comprovar pela análise colpocitológica a ocorrência da puberdade precoce em *C. porcellus* da colônia do ICTB/ Fiocruz. Das 42 fêmeas estudadas, 39 apresentaram abertura da membrana de oclusão vaginal e seis delas com idade inferior a 21 de vida. Stockard e Papanicolaou (1919) descreveram a ruptura da membrana de oclusão vaginal como indício confiável da condição de cio. Entretanto, essa condição não é, de forma alguma, o único indicativo para a caracterização do estro. Assim, a partir do exame da citologia esfoliativa vaginal, foi possível caracterizar o estro em 23 das 42 fêmeas, destas, uma com idade inferior a 21 dias, a qual apresentou predomínio de células superficiais anucleadas, indicativo dessa fase do ciclo para diferentes espécies (KÜHNEL; MENDOZA, 1992 e LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997 para cobaias; GUIMARÃES; MOREIRA; VALE, 1997 para cutias; MENDONÇA; EVÊNCIO-NETO; SIMÕES, 2007 para camundongos; BARRIL; GRISOTTO; COELHO, 2016 para ratas). Dessa maneira, a observação da ruptura da membrana de oclusão vaginal, somado a caracterização e incidência dos tipos celulares por meio da citologia vaginal, possibilitou a detecção do estro em cobaia, condizendo com o que foi relatado nos estudos realizados por Li e Shen (2015) na mesma espécie, por Santos (2012) em preás (*Galea spixii*) e por Reis (2009) em paca (*Agouti paca*).

A ocorrência de cio em idade inferior aos 21 dias explica as gestações não programadas, de fêmeas no plantel de crescimento e o fornecimento de fêmeas gestantes para pesquisa. Sobretudo, os achados desse estudo evidenciaram a necessidade de atualização do POP-SCRL-364_REV_00 (Desmame e Sexagem de Cobaias) e dos manuais de criação de animais de laboratório (ANDRADE, 2006; LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2017), os quais preconizam o desmame de cobaias em, no máximo, 21 dias de vida, mas não estipulam a idade desejável. Nesse caso, as filhas correm o risco de copularem e emprenharem de seu pai. Nossos resultados corroboram ainda com relatos anteriores quanto a ocorrência do 1º estro em cobaias aos 20 dias, onde foi mencionado como excepcional, porém possível (ROOD; WEIR, 1970).

As fêmeas que apresentaram o cio antes de 21 dias de idade apresentaram média de peso maior ($299 \pm 45,42$ g) aos 20 dias de idade em relação às demais fêmeas ($264 \pm 32,03$ g) pesadas na mesma idade. Esse dado corrobora com o estudo de Bauer, Palme, Machatschke *et al.* (2008), onde animais com dietas diferentes, no pré e pós-natal, apresentaram diferenças no desenvolvimento reprodutivo, e os que receberam dieta de alto

padrão, apresentaram idade menor ao 1º ciclo estral, com diferenças na duração do ciclo e em ciclos subsequentes.

Os resultados das observações deste estudo, nas condições aqui relatadas, demonstraram que o rompimento da membrana de oclusão vaginal ocorreu, de forma espontânea, nas fêmeas avaliadas com idade entre 15 e 60 dias. O tempo de permanência da 1ª abertura da MV apresentou grande variação (entre 1 e 12 dias ininterruptos) e foi superior ao relatado por outros autores (ALKHALAF; PROPPER; CHAMINADES *et al.*, 1992; LUNA; CORTÉS; FLORES, 2003), os quais descrevem um tempo de abertura da MV mais próximo ao observado no 2º momento de abertura verificado nesse estudo (1 a 7 dias). Adicionalmente, a maior frequência do tempo de permanência da MVA (entre 1 e 3 dias), foi condizente com o estudo de Aranibar e Echevarría (2014). Salienta-se que na primeira abertura da MV somente duas fêmeas apresentaram um tempo maior ao descrito por outros autores (8 e 12 dias). A observação macroscópica da vulva evidenciou diferenças morfológicas como inchaços, vermelhidão e secreção, semelhantes às descritas por Li e Shen (2015).

A metodologia da colpocitologia mostrou-se confiável para a caracterização da ocorrência de ciclo estral nas fêmeas do estudo, houve distribuição dos tipos celulares do epitélio vaginal que apresentaram diferenças em cada fase do ciclo estral, como no estudo de Li e Shen (2015). No proestro, foram observadas células intermediárias em maior número e moderada presença de muco. A presença de muco abundante também foi considerada característica da fase do proestro por Kühnel e Mendoza (1992). No estro, foi observado predomínio das células superficiais, sendo as anucleadas em maior número, enquanto que Kühnel e Mendoza (1992) e Lilley; Epping e Hafner (1997) apontaram uma presença mais efetiva de células superficiais nucleadas nesta fase. No metaestro e diestro os tipos celulares observados foram semelhantes ao descrito no estudo de Kühnel e Mendoza (1992), com grande número de leucócitos e aumento da quantidade de células parabasais. Para diferenciação, as lâminas caracterizadas na fase de diestro foram aquelas coletadas a partir do quinto dia da abertura da MV, período em que Alkhalaf; Propper; Chaminades *et al.* (1992) e Shomer; Holcombe e Harkness (2015) consideraram o início desta fase. Embora não tenha sido observada diferença estatística na quantidade contabilizada de cada tipo celular entre as diferentes fases do ciclo estral, houve diferença em valores absolutos obtidos nesse estudo entre os tipos celulares em cada fase, o que reforça a validade da técnica para avaliação do ciclo estral em cobaias.

Demonstrou-se, nas condições em que este estudo foi realizado, que as técnicas de coloração Panótico e Papanicolaou, não apresentaram diferenças estatísticas significativas na quantificação dos tipos celulares. As duas técnicas proporcionaram distinguir as estruturas que caracterizam cada tipo celular do epitélio vaginal, possibilitando a diferenciação e a quantificação das células durante a leitura das lâminas, confirmando estudos anteriores, os quais utilizaram uma ou outra técnica (ALKHALAF; PROPPER; CHAMINADES *et al.*, 1992; LILLEY, EPPING; HAFNER, 1997; STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1917; 1919). A coloração pelo Panótico rápido, no entanto, é menos laboriosa quando comparada ao Papanicolaou, levando apenas 40 segundos para sua execução contra os 25 minutos necessários para o Papanicolaou. Adicionalmente, o custo do kit de coloração Panótico rápido é menor do que o custo do kit e montagem de toda a bateria de coloração do Papanicolaou.

A duração do intervalo entre as aberturas apresentou uma variação entre 7 e 21 dias, ocorrendo com maior frequência entre 17 e 18 dias, maior do que as apresentadas na literatura, que descreve ciclos entre 15 e 17 dias (LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997; STOCKARD; PAPANICOLAOU, 1919; HUBRECHT, 2010), ou entre 14 e 16 dias (KÜHNEL; MENDOZA, 1992; WANG; LIU; TIAN, *et al.* 2010; LI; SHEN, 2015). A duração do ciclo estral foi também superior ao descrito em preá (*Cavia aperea*), por Silveira e Machado (1971), os quais observaram um ciclo entre 13 e 17 dias. Salienta-se ainda que, do total de fêmeas com MVA estudadas, 18 (46,15 %) apresentaram somente uma abertura, 24 (61,53 %) apresentaram duas aberturas e apenas seis (15,38 %) apresentaram três aberturas. Esses achados são condizentes com a faixa etária dos animais estudados, pois, durante a puberdade, os ciclos ovarianos são irregulares, com intervalos entre os estros mais espaçados (BAUER, PALME, MACHATSCHKE, *et al.*, 2009).

Embora não fosse parte da proposta do presente estudo, cabe o registro das razões pelas quais não foi definida a duração de cada fase do ciclo estral das fêmeas monitoradas. A revisão de literatura apontou duração da fase de estro de 8 a 24 horas, segundo Lilley, Epping e Hafner (1997), e de 8 a 11 horas, segundo Shomer; Holcombe e Harkness (2015). O estudo de Alkhalaf, Propper, Chaminadas, *et al.* (1992) aponta a fase do estro como o segundo dia da abertura da MV, com a ovulação ocorrendo 28 a 36 horas após a abertura, geralmente à noite, entre 18h00 e 6h00 (LILLEY; EPPING; HAFNER, 1997). Assim, para o melhor acompanhamento de cada fase do ciclo, seria necessário um intervalo menor entre as coletas citológicas, como também já indicado por Lilley, Epping e Hafner (1997). No entanto, não se optou por fazer mais de uma coleta diária, pois isto significaria manuseio

mais frequente dos animais e, conseqüentemente, aumento do estresse. Assim, optou-se por adotar uma metodologia que causasse menor distúrbio na rotina de manejo diário dos animais estudados de forma a preservar o seu bem-estar. Além disso, ao contrário de Lilley, Epping e Hafner (1997), no presente estudo a ruptura da membrana de oclusão vaginal não foi forçada mecanicamente. Todas as coletas de material para citologia vaginal nesse estudo foram realizadas apenas durante os intervalos de ruptura natural, levando-se em consideração, sobretudo, que o estudo foi conduzido em fêmeas muito jovens, com até 60 dias de idade.

As variações dos tipos celulares do epitélio vaginal pavimentoso estratificado, observadas nas diferentes fases do ciclo estral em cobaias, ocorrem em virtude das alterações hormonais, as camadas mais superficiais proliferam sob influência de progestágenos e as camadas mais profundas proliferam sob ação de estrógenos (DEANESLY, 1966; TOUMA; PALMER; SACHER, 2001). Para avaliar de forma acurada o ciclo estral em cobaias é necessária a análise hormonal, o qual pode ser realizada, por exemplo, em amostras sanguíneas ou fecais (BAUER *et al.*, 2008). Para realizar a análise por amostras de sangue é necessário realizar a coleta por punção cardíaca (CHALLIS *et al.*, 1971; FEDER *et al.*, 1968; GARRIS, 1986), corte da unha (GRACE; O'DELL, 1970), punção das veias da orelha (SACHSER; PRÖVE, 1984) ou implantação de cateteres (BLATCHLEY *et al.*, 1976; LIU *et al.*, 2001). Porém, todas estas técnicas são invasivas e exigem contenção anestésica ou física, o que acarreta a produção elevada de glicocorticoides, como o cortisol, que interferem nos níveis basais dos hormônios sexuais (SACHSER, 1994). Além de serem necessárias coletas frequentes em volumes grandes para realização de monitoramento hormonal a longo prazo (BAUER *et al.*, 2008). A análise por amostras fecais é uma alternativa não invasiva, podendo ser realizadas coletas repetitivas que não interferem com o *status* endócrino do animal (BAUER *et al.*, 2008), mas requer isolamento do animal alvo ou manejo rigoroso de forma a não coletar as fezes do animal não alvo do monitoramento hormonal.

Este estudo optou por não realizar a análise hormonal pelo mesmo motivo que não realizou a coleta de *swabs* vaginais em períodos onde a MV não estava totalmente aberta: priorização do bem-estar dos animais, uma vez que as fêmeas do estudo se encontravam em idade pré-desmame.

Mesmo com essas limitações metodológicas, porém alinhadas aos 3R's (RUSSEL; BURCH, 1959) na pesquisa com animais visando seu bem-estar, foi possível caracterizar o estro. Não foram encontrados dados na literatura pesquisada, quanto à duração do ciclo estral

e suas fases para *C. porcellus* abaixo de 60 dias de idade, conferindo um caráter inédito aos dados apresentados nesse estudo.

7. CONCLUSÕES

O estudo realizado contribui com nova informação acerca dos dados reprodutivos de cobaia (*Cavia porcellus*), idade de início da puberdade, em um período que usualmente encontram-se no grupo família em instalação animal para ensino e pesquisa.

Conclui-se então que, nas condições em que o estudo foi realizado, as cobaias apresentam rompimento da membrana de oclusão vaginal e citologia vaginal característica a fase do estro, apontando uma puberdade com início em uma idade inferior a 21 dias. As diferenças no desenvolvimento corpóreo (peso) das fêmeas, que apresentaram precocidade, é um dos possíveis fatores na distribuição da idade nas aberturas de membrana vaginal. O rompimento da membrana de oclusão ocorre de maneira gradativa, em alguns casos, apresentando uma fase parcialmente aberta, impossibilitando a coleta citológica. Foi possível acompanhamento, dos 15 aos 60 dias de vidas, de até três períodos de aberturas da membrana vaginal.

A análise macroscópica da membrana de oclusão não deve ser utilizada como única técnica para determinação do estro. O primeiro dia da abertura da membrana vaginal não corresponde necessariamente ao estro fazendo-se necessário a utilização de outras técnicas para confirmação. A colpocitologia mostrou-se confiável na caracterização do estro em cobaias, permitiu diferenciar os tipos celulares do epitélio pavimentoso estratificado e caracterizar a distribuição nas diferentes fases do ciclo estral.

As colorações Panótico rápido e Papanicolau possibilitaram distinguir e contabilizar os achados citológicos em cobaias. A coloração Panótico tem como vantagem, em relação a coloração Papanicolau, a agilidade no tempo de execução da técnica. As duas técnicas são eficientes para estudos de avaliação de ciclo estral em cobaias Short Hair.

Com a puberdade e caracterização do estro no período em que os animais se encontram no grupo familiar, é necessário modificar as práticas de manejo das cobaias, adequando a idade de desmame, usualmente utilizados ICTB/ Fiocruz.

Conhecer os parâmetros reprodutivos é fundamental para a manutenção e criação de biomodelos, pois possibilita um maior controle e rigor no gerenciamento e planejamento das colônias. Portanto, a elaboração de Procedimentos Operacionais Padrão (POP) para as colônias de criação animal deve estabelecer rotinas bem definidas, documentar quais procedimentos são executados, definir responsabilidades, ser uma fonte de consulta rápida e

de fácil acesso na execução das atividades, e principalmente, capacitar os profissionais a atuarem no manejo animal de maneira ética e segura. Com base nesses pressupostos e nos resultados obtidos no estudo, o POP-SCRL-364_REV_00 (Desmame e Sexagem de Cobaia) foi revisado para ajuste da idade ao desmame, passando de 21 para 16 dias, de forma a evitar o risco de gestações não programadas e, conseqüentemente, atender ao R da redução do número de animais nascidos e não utilizados na pesquisa. Importante ressaltar que essa redução na idade de desmame não compromete o bem-estar dos animais, nem seu desenvolvimento, uma vez que a Resolução Normativa Nº 33 de 2016 do CONCEA recomenda o desmame ainda mais cedo, aos 14 dias de idade ou peso superior a 180g.

Espera-se ainda que os resultados desse estudo possam subsidiar adequações também nos guias e manuais de manejo de *C. porcellus* em criatórios científicos.

REFERÊNCIAS

ALKHALAF, M.; PROPPER, A. Y.; CHAMINADAS, G.; *et al.* Ultrastructural changes in guinea pig endometrial cells during the estrous cycle. **Journal of Morphology**, v. 214, n. 1, p. 83–96, 1992. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmor.1052140106>>. Acesso em: 4 jun. 2020.

ANDRADE, A.; PINTO, SC; OLIVEIRA, RS., orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.

ARANÍBAR, E.; ECHEVARRÍA C., L. Número de ovulaciones por ciclo estrual en cuyes (*Cavia porcellus*) andina y perú. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 25, n. 1, 3 jul. 2014.

BARRIL, N.; GRISOTTO, A.C.D.; GARCIA, J.C. De las fases del ciclo estral en ratas wistar. **Revista Cuidarte Enfermagem**, v. 10, n. 2, p. 162 – 164. jul/dez. 2016.

BAUER B, PALME R, MACHATSCHKE IH, DITTAMI J, HUBER S. Non-invasive measurement of adrenocortical and gonadal activity in male and female guinea pigs (*Cavia aperea f. porcellus*). **Gen Comp Endocrinol**. 2008; 156(3):482-489.

BIERLE, C. J.; FERNÁNDEZ-ALARCÓN, C.; HERNANDEZ-ALVARADO, N. *et al.* Assessing Zika virus replication and the development of Zika-specific antibodies after a mid-gestation viral challenge in guinea pigs. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187720, 2017. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0187720>. Acesso em: 10 fev. 2019.

BIRKE, L.I.A. Some Behavioural Changes Associated with the Guinea-pig Oestrous Cycle. **Zeitschriftfür Tierpsychologie**, v. 55, n. 1, p. 79–89, 1981. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0310.1981.tb01260.x>. Acesso em: 4 mar. 2019.

BLATCHLEY FR, DONOVAN BT, TER HAAR MB. Plasma progesterone and gonadotrophin levels during the estrous cycle of the guinea pig. **Biol. Reprod**. 1976; 15:29–38.

BORGES, R.F.; CARDOSO, K.C.F.; BOLZAN, A.A.; MOMO C.; HONSHO, C.S. Estudo comparativo de métodos de coleta e coloração para citologia conjuntival em cães normais. **Vet. e Zootec.** 2012 set.; 19(3): 381-391.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. Resolução Normativa CONCEA nº 33, de 18.11.2016 – Capítulo “Procedimentos Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. 18 nov. 2016, p. 13.

CANNING, B.J.; CHOU, Y. Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 21, n. 5, p. 702–720, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1094553908000096>. Acesso em: 26 fev. 2019.

CARVALHO, I.R. **Histomorfometria ovariana de felinos domésticos (Felis catus) em distintas faixas etárias.** 2013. 33 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Jaboticabal, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/98167>.

CARVALHO, L.I.S.; PAULA, R.A.O.; CARNEIRO, D.R Avaliação citopatológica da mucosa vaginal de camundongas tratadas com um antiandrogênico, **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 1, p. 417-426, jan./jul. 2013

CASHMAN, K.A.; WILKINSON, E.R.; WOLLEN, S.E. et al. DNA vaccines elicit durable protective immunity against individual or simultaneous infections with Lassa and Ebola viruses in guinea pigs. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 13, n. 12, p.3010–3019, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2017.1382780>. Acesso em: 10 fev. 2019.

CHALLIS JRG, HEAP RB, ILLINGWORTH DV. Concentrations of oestrogen and progesterone in the plasma of non-pregnant, pregnant and lactating guinea-pigs. **J. Endocrinol.** 1971; 51:333–348.

CORA, M.C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 6, p. 776–793, 2015. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623315570339>. Acesso em: 4 ago. 2018.

DEANESLY, R. Pro-oestrus in the guinea-pig: hormonal stimulation of the vaginal epithelium. **Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 205-NP, 1966. Disponível em: <http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/jrf.0.0120205>. Acesso em: 12 set. 2018.

DEANESLY, R. The effects of progesterone, testosterone and ergocornine on non-pregnant and pregnant guinea-pigs. **Reproduction**, v. 16, n. 2, p. 271–281, 1968. Disponível em: <http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/jrf.0.0160271>. Acesso em: 17 ago. 2018.

DUNKIN, G. W.; HARTLEY, P.; LEWIS-FANING, E. *et al.* A Comparative Biometric Study of Albino and Coloured Guinea pigs from the point of view of their Suitability for Experimental Use. **The Journal of Hygiene**, v. 30, n. 3, p. 311–330, 1930. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2170564/>. Acesso em: 3 mar. 2019.

FEDER HH, RESKO JA, GOY W. Progesterone concentrations in the arterial plasma of guinea-pigs during the oestrous cycle. **J. Endocrinol.** 1968; 40:505–513.

FOUNDATION FOR BIOMEDICAL RESEARCH. **Nobel-winning animal research leads to huge breakthroughs in science and medicine.** Disponível em: <https://fbresearch.org/medical-advances/nobel-prizes/>. Acesso em: 11 fev. 2019.

GARRIS DR. The ovarian–adrenal axis in the guinea pig: effects of photoperiod, cyclic state and ovarian steroids on cortisol levels. **Horm. Metab. Res.** 1986; 18:34–37.

GRACE ND, O'DELL BL. Interrelationship of dietary magnesium and potassium in the guinea pig. **J. Nutr.** 1970; 100:37–44.

GUIMARÃES, D.A.; MOREIRA, D.; VALE, W.G. Determinação do ciclo reprodutivo da cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) através do diagnóstico colpocitológico. **Acta Amazonica**, v. 27, n. 1, p. 55-64, 1997.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. Ciclos Reprodutivos. In: **Reprodução Animal**. 7ª ed. Barueri: Manole, 2004. p. 55-67.

HUBRECHT, R. **The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals**, 8th.edn.849p. pp. 380 - 398, 2010.

JONES, F. G.; JAMIESON, W. A. Studies on Tetanus Toxoid. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 1, p. 33–40, 1936. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC543761/>. Acesso em: 26 fev. 2019.

JÖRUNDSSON, E; LUMSDEN, J.H.; JACOBS, R.M. Rapid Staining Techniques in Cytopathology: A Review and Comparison of Modified Protocols for Hematoxylin and Eosin, Papanicolaou and Romanowsky Stains. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 28, n. 3, p. 100–108, 1999. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-165X.1999.tb01057.x>. Acesso em: 4 mar. 2019.

KAISER, S.; KÜNZL, C.; SACHER, N. **The guinea pig**. In: *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. 8th ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2010. p. 380-398, 2010.

KALISTE, E. 2 ed. **The welfare of laboratory animals**. Nachdred. Dordrecht: Springer, pp. 181-209. 2007.

KOCH, R. Die Atiologie der Tuberculose. **Berliner Klinischen Wochenschrift**, n. 15, p. 221-230, 1882.

KUGELMEIER, T.; VALLE, RR.; GUIMARÃES, M.A.B.V. *et al.* Tracking the Ovarian Cycle in Black-and-Gold Howlers (*Alouatta caraya*) by Measuring Fecal Steroids and Observing Vaginal Bleeding. **International Journal of Primatology**, v. 32, n. 3, p. 605–

615, 2011. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10764-010-9490-7>. Acesso em: 23 fev. 2019.

KÜHNEL, W.; MENDOZA, A.S. Scanning Electron Microscope Investigations on the Vaginal Epithelium of the Guinea Pig during the Estrous Cycle. **Archives of Histology and Cytology**, v. 55, n. Suppl, p. 205–210, 1992. Disponível em: http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/aohc1982/55.Suppl_205?from=CrossRef. Acesso em: 19 fev. 2019.

KUMAR, M.; KRAUSE, K.K.; AZOUZ, F. *et al.* A guinea pig model of Zika virus infection. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, 2017. Disponível em: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-017-0750-4>. Acesso em: 10 fev. 2019.

KÜNZL, C.; SACHSER, N. The Behavioral Endocrinology of Domestication: A Comparison between the Domestic Guinea Pig (*Cavia apereaf. porcellus*) and Its Wild Ancestor, the Cavy (*Cavia aperea*). **Hormones and Behavior**, v. 35, n. 1, p. 28–37, 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0018506X98914933>. Acesso em: 3 mar. 2019.

LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M; KO, G.M.,orgs. **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora ATHENEU, 2017.

LI, J.R.; SHEN, T., Expression characteristics of MMP-2 and MMP-9 in guinea pig ovaries during the estrous cycle, **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 17329–17340, 2015.

LILLEY, K. G.; EPPING, R. J.; HAFNER, L. M. The guinea pig estrous cycle: correlation of vaginal impedance measurements with vaginal cytologic findings. **Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 6, p. 632–637, dez. 1997.

LIMA, D. N. O. **Atlas de citopatologia ginecológica**/ Daisy Nunes de Oliveira Lima – Brasília: Ministério da Saúde; CEPESC: Rio de Janeiro, 2012. 204p.; Il.

LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência dos hormônios esteróides na foliculogênese. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n4, p.472-482, out/dez. 2011.

LIU L, LI A, MATTHEWS SG. Maternal glucocorticoid treatment programs HPA regulation in adult offspring: sex-specific effects. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 2001; 280:E729–E739.

LORD, E.; COLLINS, C.; DEFRANCE, S.; *et al.* Ancient DNA of Guinea Pigs (*Cavia* spp.) Indicates a Probable New Center of Domestication and Pathways of Global Distribution. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8901, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-65784-6>. Acesso em: 23 set. 2020.

LUCHESE, L. C. Maturação sexual, ciclos reprodutivos e da temperatura do roedor rabo-de-facho (*Trinomys yonenagae*, echimyidae). 2010. 106f. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LUNA, F; CORTÉS, M; FLORES, M. *et al.* The effects of superior ovarian nerve sectioning on ovulation in the guinea pig. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 1, p. 61, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC222920/>. Acesso em: 11 maio 2018.

MAIA, K. M. **Fisiologia e controle do ciclo estral em fêmeas de cateto (*Tayassa tajacu*, *Linnaeus, 1758*) mantidas em cativeiro no semi-árido brasileiro**. 92f.:il. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609–614, 2002. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1519-69842002000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 17 ago. 2018.

MARIA-ENGLER, Silvy Stuchi; CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes. **Citologia clínica cérvico-vaginal: texto e atlas**. [s.l.: s.n.], 2012. Disponível em: <<http://site.ebrary.com/id/11004614>>. Acesso em: 9 fev. 2020.

MEDICAL ADVANCES AND ANIMAL RESEARCH. **The contribution of animal science to the medical revolution: some case histories**. Disponível em: <https://speakingofresearch.files.wordpress.com/2008/03/medical-advances-and-animal-research1.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2019.

MENDONÇA, F. DE S.; EVÊNCIO-NETO, J; SIMÕES, M.J; CAMARGO. L.M; BARATELLA-EVÊNCIO, L. Aspectos citopatológicos da mucosa vaginal de camundongas tratadas com progesterona. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 313-318, abr./jun. 2007.

MEURS, H.; SANTING, RE.; REMIE, R. *et al.* A guinea pig model of acute and chronic asthma using permanently instrumented and unrestrained animals. **Nature Protocols**, v. 1, p. 840, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.144>.

MICHAELIS. **Dicionário da língua Portuguesa**. Disponível em: <http://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/cobaia/>. Acesso em: 16 jan. 2019.

MONTICELLI, P.F. **Aspectos acústicos da domesticação: os chamados de corte e alerta no preá *Cavia aperea* e na cobaia *Cavia porcellus***. 2000. 84f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MONTICELLI, P.F. **Comportamento e comunicação acústica em cobaias e preás**. 2005. 161f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PAPANICOLAOU, G.N.; HERBERT F. Traut. The Diagnostic Value of Vaginal Smears in Carcinoma of the Uterus. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 42, n. 2, p. 193-206, 1941.

PAZHOOHAN, Saeed; RAOUFY, Mohammad Reza; JAVAN, Mohammad; *et al.* Effect of Rho-kinase inhibition on complexity of breathing pattern in a guinea pig model of asthma. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5663484/>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

PIMENTEL, M.M.L.; SANTOS, F.A.; DIAS, R.V.C. *et al.* Monitoramento do ciclo estral de fêmeas equinas por meio de citologia vaginal, ultrassonografia e dosagem hormonal. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 1, 2015. Disponível em: <http://www.revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/4920>. Acesso em: 18 fev. 2019.

PINHEIRO, L.J.; PARANAÍBA, L.F.; ALVES, A.F. *et al.* Salivary Gland Extract Modulates the Infection of Two *Leishmania enriettii* Strains by Interfering With Macrophage Differentiation in the Model of *Cavia porcellus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5986888/>. Acesso em: 8 mar. 2019.

REIS, A.C.G. **Estudo colpocitológico e aspectos endócrinos de pacas (*Agouti paca*, L.1766) adultas**. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009

RIBEIRO, V.M.F.; RUMPF, R.; SATRAPA, R. *et al.* Quadro citológico vaginal, concentração plasmática de progesterona durante a gestação e medidas fetais em paca (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766). **Acta Amazonica**, v. 42, n. 3, p. 445–454, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672012000300018&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 18 fev. 2019.

ROOD, J.P; WEIR, B.J. Reproduction in female wild guinea-pigs. **F. Reprod. Fert.** 1970; 23, 393-409.

RUSSEL, W.M.S.; BURCH,R.L. The principles of human experimental technique. 1959. Disponível em: URL: [http://altweb.jhsph.edu/publications/humane exp/het-toc.htm](http://altweb.jhsph.edu/publications/humane%20exp/het-toc.htm).

SACHSER N, PRÖVE E. Short term effects of residence on testosterone responses to fighting in alpha male guinea pigs. **Aggr. Behav.** 1984; 10:285–292.

SACHSER, N.; LICK, C.; BEER, R, W.R. Tagesgang von Serum-Hormonkonzentrationen und ethologischen Parametern bei Hausmeerschweinchen. **Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft**, v. 85, n.120, 1992.

SACHSER N. **Sozialphysiologische Untersuchungen an Hausmeerschweinchen**. Paul Parey; Berlin, Hamburg: 1994. pp. 21–23.

SANTOS, A.C. **Expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase, NADPH-citocromo P450 redutase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-liase) na vagina de fêmeas de preás (*Galea spixii*, Wagler, 1831)**. 118f., il. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SHERLOCK, I. A.; MUNIZ, T. M. Transmissão do Trypanosoma Cruzi em tres gerações de *Cavia porcellus* sem a participação de Triatomíneos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 10, n. 1, p. 27-29, 1976.

SHOMER, Nirah H.; HOLCOMBE, Hilda; HARKNESS, John E. Biology and Diseases of Guinea Pigs. *In: Laboratory Animal Medicine*. [s.l.]: Elsevier, 2015, p. 247–283. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095274000067>. Acesso em: 4 jun. 2020.

SILVEIRA Filho, J. F.; MACHADO, J. C. Alterações do epitélio e esfregaços vaginais da preá (*Cavia aperea aperea*) durante o ciclo estral e estudo comparativo com as da cobaia. **Mem. Inst. Butantan**, 35, 63-78, 1971.

SMITH, J. W. G. Simultaneous active and passive immunization of guinea-pigs against tetanus. **The Journal of Hygiene**, v. 62, n. 3, p. 379–388, 1964. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2134701/>. Acesso em: 26 fev. 2019.

STOCKARD, C.R.; PAPANICOLAOU, G.N. The vaginal closure membrane, copulation, and the vaginal plug in the guinea-pig, with further considerations of the oestrous rhythm.

The Biological Bulletin, v. 37, n. 4, p. 222–245, 1919. Disponível em: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.2307/1536207>. Acesso em: 14 maio 2018.

SUN, S.Y.; ZHANG, W.; HAN, X. *et al.* Cell proliferation and apoptosis in the fetal and neonatal ovary of guinea pigs. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 1570–1578, 2014. Disponível em: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2014/vol13-1/pdf/gmr2979.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2019.

SUTHERLAND, S.D.; FESTING, M.F.W. **The guinea - pig**. In: *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, 6th edn Churchill Livingstone: Ed. Poole, T.B. pp. 393 – 410, 1987.

TOUMA, C.; PALME, R.; SACHSER, N. Different types of oestrous cycle in two closely related South American rodents (*Cavia aperea* and *Galea musteloides*) with different social and mating systems. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 791–801, 2001. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/121/5/791.xml>. Acesso em: 3 mar. 2019.

TREWIN, A.L; CHAFFIN, C.L; WATANABE, G; TAYA, K; HUTZ, R.J. Cyclic Changes in Serum Follicle-Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone and Inhibin During the Guinea Pig Estrous Cycle. **Journal of Reproduction and Development**, Vol. 44, No. 4, 1998.

VIEIRA, M.M.F. Detecção do ciclo estral por meio de citologia vaginal de cadelas atendidas no hospital veterinário da UNIVIÇOSA/FACISA. **Anais IV SIMPAC**, v. 4, n.1, p. 143-148, 2012.

WANG, W.; LIU, H.; TIAN, W. *et al.* Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 11, n. 5, p. 307–314, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1631/jzus.B0900391>. Acesso em: 8 mar. 2019.

WEIR, B. J. Notes on the origin of the domestic guinea-pig. **Symposia of the Zoological Society of London (UK)**, 1974. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XE7611668>. Acesso em: 3 mar. 2019.

WILLIAMS, A.; GOONETILLEKE, N. P.; MCSHANE, H. *et al.* Boosting with Poxviruses Enhances Mycobacterium bovis BCG Efficacy against Tuberculosis in Guinea Pigs. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 6, p. 3814–3816, 2005. Disponível em: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.73.6.3814-3816.2005>. Acesso em: 10 fev. 2019.

YOUNG, R. M.; MOOD, G. M. Effect of penicillin on infection of guinea pigs with Corynebacterium diphtheriae. **Journal of Bacteriology**, v. 50, p. 205–212, 1945.

ZHANG, K.; XU, W. W.; ZHANG, Z. *et al.* The innate immunity of guinea pigs against highly pathogenic avian influenza virus infection. **Oncotarget**, v. 8, n. 18, 2017. Disponível em: <http://www.oncotarget.com/fulltext/16503>. Acesso em: 10 fev. 2019.

ZINNEMANN, K. Neutralisation of C. diphtheriae type toxins with standard antitoxin, as determined by skin reactions in guinea-pigs. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 58, p. 43–50, 1946.

APÊNDICES

APÊNDICE B – Controle de coleta de material vaginal

Número da lâmina	Identificação do animal	Coleta (ordem e data)		
1	46137	7ª coleta - 28/09		
2	20653	1ª coleta - 26/09		
3	6210	6ª coleta - 28/09		
4	46137	23-set		
5	20651	5-out		
6	20655	23-out		
7	20651	21-out		
8	20654	24-out		
9	20655	7-nov		
10	20653	2ª coleta - 28/09		
11	20655	26-out		
12	20655	24-out		
13	20655	25-out		
14	46137	29-set		
15	6210	5ª coleta - 26/09		
16	20654	25-out		
17	20655	22-out		
18	6209	30-set		
19	6210	29-set		
20	6210	14-out		
21	20651	20-out		
22	46137	22-set		
23	6209	1-out		
24	20654	22-out		
25	20654	23-out		
26	46137	24-set		
27	6210	20-set		
28	20651	4-out		
29	46137	6ª coleta - 27/09/2018		
30	20663	29-set		
31	20651	1ª coleta		
32	6210	1ª coleta		
33	20651	20-set		
34	20655	8-nov		
35	46209	18-out		
36	46137	25-set		
37	20651	2ª coleta		

APÊNDICE D – Diagrama desenho experimental EDA

