

# Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal

*Determination of estrous cycle in rats by vaginal lavage*

**Resumo**  
Objetivo: determinar as fases do ciclo estral em ratas, utilizando o lavado vaginal, fornecendo a pesquisadores considerações úteis para o seu reconhecimento. Métodos: coleta da secreção vaginal de ratas wistar, por lavado vaginal a fresco, observada em microscópio óptico com objetivas de 10 e 40 vezes, realizada pela manhã, durante dois ciclos completos, em 70 ratas. Resultados: o ciclo estral tem duração média de quatro dias e pode ser dividido em diestro I e II, proestro e estro, os quais podem ser determinados pela distribuição dos tipos celulares no lavado vaginal. Os três tipos celulares que predominam são os leucócitos, células arredondadas nucleadas e células epiteliais cornificadas. Conclusão: o lavado vaginal de ratas constitui um método importante para o estudo das alterações que ocorrem durante o ciclo estral, devido às mudanças abruptas nos níveis de estradiol que ocorrem nas quatro fases do ciclo. A observação é rápida e fácil de ser realizada.

**Abstract**  
Purpose: to determine the estrous cycle phases in rats, through vaginal lavage, providing researchers with useful information for their recognition. Method: vaginal secretion was collected from Wistar Rats by fresh vaginal lavage, observed under an optical microscope magnified ten and forty times. This procedure was done in the morning, during two complete estrous cycles in seventy rats. Results: the estrous cycle lasts four days on average and can be divided in diestrus I and II, proestrus and estrus, which can be determined by the distribution of cell types in the vaginal lavage. The three cell types that predominate are leukocytes, round nucleated cells and cornified epithelial cells. Conclusion: the vaginal lavage in rats is an important method for the study of the alterations that occur during the estrous cycle. Such alterations are due to the abrupt changes in the level of estradiol during the phases of the cycle. The observation is fast and easy to be achieved.

Márcio Gomes Vilela<sup>1</sup>  
João Lúcio dos Santos Júnior<sup>2</sup>  
João Gilberto de Castro e Silva<sup>2</sup>

#### Palavras-chave

Ciclo estral  
Vagina/citologia  
Estradiol  
Ratos wistar

#### Key words

Estrous cycle  
Vaginal cytology  
Rat

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>1</sup> Mestre em Medicina pela UFMG, Doutorando em Medicina pela UFMG

<sup>2</sup> Mestre e Doutor em Medicina pela UFMG

## Introdução

A determinação do ciclo estral em animais é importante para estudos da função neuro-endócrina e pode ser monitorado facilmente e de maneira não invasiva, observando-se as mudanças diárias na citologia vaginal. Os primeiros trabalhos sobre o ciclo estral foram realizados em porcos da Índia por Stockard e Papanicolaou (1917). Long e Evans (1922) estudaram o ciclo estral em ratas e Allen (1922) estudou o ciclo em camundongos.

O conhecimento do ciclo estral permite avaliação precisa da atividade ovariana, já que esta muda abruptamente devido às flutuações nos níveis de estradiol, como também qualquer alteração que leve à ruptura desse padrão por agentes ambientais ou tóxicos. A determinação do ciclo estral é de suma importância em procedimentos de pesquisa, pois, além de evitar uma série de vieses devido a alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo, permite conseguir grupo mais homogêneo, importante em alguns tipos de ensaios.

Didaticamente, o ciclo estral das ratas podem ser dividido em quatro fases: diestro I, diestro II, proestro, estro. Cada fase tem duração média de 24 horas e está relacionada diretamente com a flutuação dos níveis de estradiol. Essas alterações começam na puberdade e terminam na senectude, geralmente quando os animais completam um ano. Isto é relevante, uma vez que ensaios anteriores à puberdade ou após a senectude podem alterar a confiabilidade dos dados obtidos, devido à ausência da atividade endócrina ovariana.

## Diestro I e II

Esses períodos apresentam concentrações baixas do nível sérico de estradiol e ao esfregaço vaginal exibem leucócitos em número mais alto, poucas células fusiformes cornificadas e algumas células epiteliais (Figura 1).

No diestro II, observa-se esfregaço praticamente constituído apenas por leucócitos (Figura 2).

## Proestro

Com o aumento dos níveis séricos de estradiol, há atividade proliferativa do epitélio vaginal, com o predomínio de células arredondadas, polinucleadas que podem estar dispersas ou agrupadas. É nesta fase do ciclo que os níveis de estradiol estão mais altos e na qual ocorre o pico de LH (Figura 3).

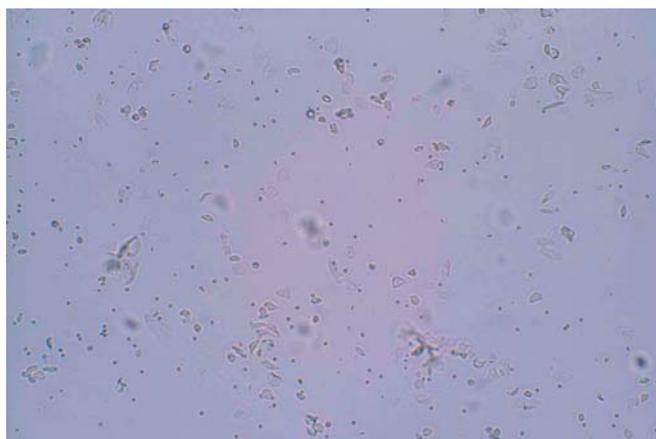


Figura 1 - Fotomicrografia ótica demonstrando diestro I – predomínio de leucócitos com presença de células cornificadas e células epiteliais



Figura 2 - Fotomicrografia demonstrando diestro II – predomínio de leucócitos

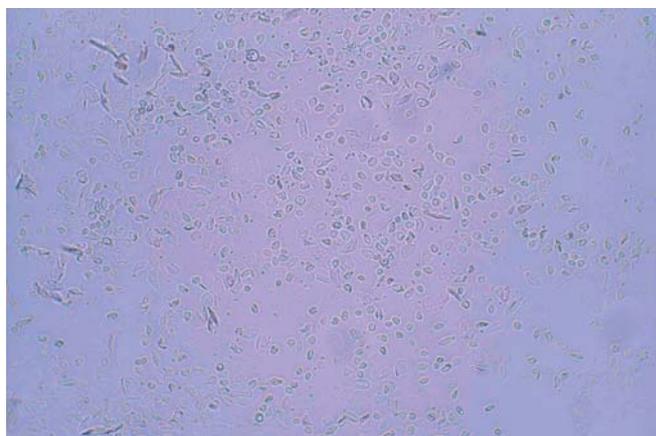


Figura 3 - Fotomicrografia demonstrando proestro – predomínio de células epiteliais nucleadas.

## Estro

Com a queda dos níveis de estradiol coincidentemente com a ovulação e formação do corpo lúteo, há diminuição da proliferação do epitélio vaginal, apresentando esfregaço vaginal constituído predominantemente de células cornificadas, dando o aspecto de “folhas secas” (Figura 4).

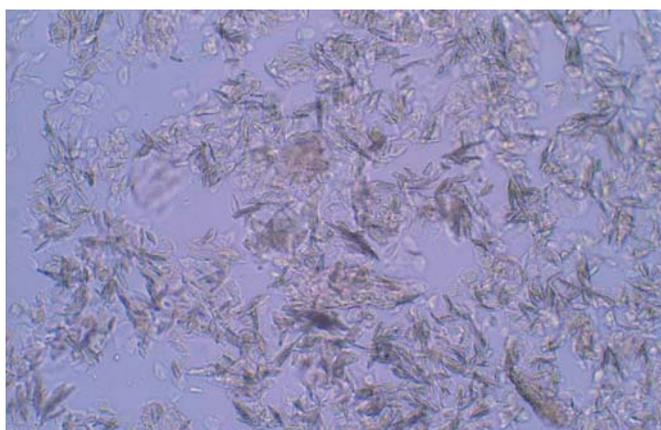


Figura 4 - Fotomicrografia demonstrando estro – predomínio de células cornificadas

Alguns autores relatam curto período entre o estro e o diestro, quando se observam células cornificadas e leucócitos denominados metaestro. Contudo, a presença de leucócitos no esfregaço vaginal indica que a fase do ciclo em questão não é estro (Cooper *et al.*, 1998).

São similares as relações entre atividade ovariana e esfregaço vaginal entre ratas e camundongos. O início da puberdade é marcado pela ocorrência de esfregaço totalmente cornificado, que sinaliza ter acontecido a primeira ovulação.

Algumas situações sociais ajudam a ter regularidade no ciclo estral. Fêmeas em gaiolas com machos tendem a ter ciclos mais regulares. Existe a probabilidade de fêmeas permanecerem com esfregaço leucocitário (anestro) por semanas, quando em gaiolas com o mesmo sexo. Portanto, em condições ambientais normais, o lavado vaginal identifica as fases do ciclo estral e se houve ovulação ou não.

## Coleta do lavado vaginal

Assim como alterações sociais podem alterar o ciclo estral, interferências ambientais também têm influência significativa nesse processo. Ciclos ovarianos podem ser avaliados em roedores se os animais estão em condições normais de fotoperíodo.

É considerado ideal o esquema de luminosidade de 14:10 horas ou 12:12 horas claro-escuro. Alterações na duração do fotoperíodo levam à interrupção do ciclo estral. Os animais mantidos em condições ideais de ciclo claro-escuro apresentam ciclos normais por aproximadamente um ano, a não ser que sejam acasalados ou submetidos a alguma condição experimental ou tóxica que possa alterar o ciclo.

Para realizar o lavado vaginal, utiliza-se uma pipeta feita com a ponteira de polietileno de uma micropipeta e látex de garrote, que possa conter aproximadamente uma gota (0,3 ml) de solução salina 0,9% (Figura 5). As bordas da ponteira devem ser rombas para não machucarem as paredes vaginais.



Figura 5 - Pipeta para coleta do lavado vaginal

Neste estudo, a ponta da ponteira foi introduzida no orifício vaginal, com cuidado para não estimular a cérvix uterina. Uma gota de solução salina foi injetada, aspirada e colocada em uma lâmina para visualização ao microscópio, com magnificação de 10 e 40 vezes, sem a necessidade do uso de lamínula.

A coleta foi realizada diariamente, no mesmo horário e o ciclo acompanhado por um mínimo de duas semanas, para garantir-se a certeza de sua regularidade, antes de realizar o experimento.

Na primeira semana de acompanhamento, observou-se variabilidade da atividade ovariana reconhecida pelo lavado vaginal. Alguns grupos de ratas mantidos na mesma gaiola podem apresentar 20 a 30% de animais com ciclos alterados; outras vezes, essa presença pode ser baixa, alcançando 5%. Esse fato demonstra a necessidade de acompanhamento diário do ciclo, principalmente em estudos randomizados em que todos os animais devem estar nas mesmas condições ou, senão, quando a amostra deve ser coletada em determinada fase do ciclo.

A determinação do ciclo estral é de fundamental importância em estudos toxicológicos e com compostos que alteram o ciclo. Além do mais, oferece a possibilidade de averiguar a presença do *plug* copulatório ou de esperma após o acasalamento, a determinação de gravidez após o acasalamento ou a continuidade do ciclo nas não grávidas.

Assim, a distinção entre pseudogravidez e gravidez é feita pela duração de dias que o esfregaço vaginal permaneceu leucocitário. Pseudogravidez é uma gravidez endócrina que pode ser experimentalmente induzida pela estimulação da cérvis uterina no diestro II, proestro ou estro (Cooper et al., 1998; Lehmann & Erskine, 2004). Sua duração é de aproximadamente 14 dias, enquanto da gravidez é de 21 a 23 dias. Outro dado de importância é a indicação de morte fetal pela verificação de

sangue no esfregaço, que pode ocorrer após 12 dias de gestação (Cooper et al., 1998).

---

## Considerações finais

---

O reconhecimento das fases do ciclo estral, principalmente no estudo do controle da função neuro-endócrina, é importante na pesquisa experimental em ginecologia. A identificação da atividade ovariana normal e a extensão do comprometimento desta quando esses animais são expostos a determinadas drogas, cirurgias ou agentes tóxicos fornecem subsídios para pesquisa básica que vise ao melhor conhecimento e sua utilidade na atividade clínica.

---

## Leituras suplementares

---

1. Allen E. The oestrous cycle in the mouse. *Am J Anat.* 1922; 30:297 – 347.
2. Cooper RL, Goldman JM, Vandenberg JG. Monitoring of the estrous cycle in laboratory rodent by vaginal lavage. In: Heindel JJ, Chapin RE. *Female reproductive toxicology*. London: Academic Press; 1998. p.45-56.
3. Lehmann ML, Erskine MS. Induction of pseudo pregnancy using VCS: importance of lordosis intensity and prestimulus estrous cycle length. *Horm Behav.* 2004; 45(2): 75-83.
4. Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem Univ California* 1922; 6:1-148.
5. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002; 62(4a):609-14.
6. Stockard CR, Papanicolaou GN. The existence of a typical estrous cycle in guinea pig with a study of its histological and physiological changes. *Am J Anat.* 1917; 22:225 - 65.