

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

MAÍRA CORONA DA SILVA

**EFEITO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA (VITAMINA B6) NA INDUÇÃO
DO ESTRO E NA PEUDOGESTAÇÃO DE CADELAS**

ILHÉUS – BAHIA

2017

MAÍRA CORONA DA SILVA

**EFEITO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA (VITAMINA B6) NA INDUÇÃO
DO ESTRO E NA PEUDOGESTAÇÃO DE CADELAS**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal

Área de concentração: Ciência Animal

Orientadora: Prof^a. Dra. Paola P. das Neves Snoeck

ILHÉUS – BAHIA

2017

S586 Silva, Maíra Corona da.
Efeito do cloridrato de pirodoxina (vitamina B6) na indução do estro e na pseugestação de cadelas / Maíra Corona da Silva. – Ilhéus : UESC, 2017.
59f.
Orientadora : Paola P. das Neves Snoeck.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz.
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.
Inclui referências e anexo.

1. Cadela – Lactação – Controle. 2. Vitaminas – Nutrição animal. 3. Vitaminas – Efeitos colaterais. I. Snoeck, PaolaP. Neves.
II. Título.

CDD – 636.0896151

MAÍRA CORONA DA SILVA

**EFEITO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA (VITAMINA B6) NA INDUÇÃO
DO ESTRO E NA PEUDOGESTAÇÃO DE CADELAS**

Ilhéus – BA, 27/07/2017

Paola P. das Neves Snoeck – *DSc*
UESC/DCAA
(Orientador)

Fabiana Lessa Silva – *DSc*
UESC/DCAA
(Co-Orientador)

Maria Denise Lopes – *Dsc*
UNESP/Botucatu

Juneo Freitas Silva - *DSc*
UESC/DCB

Renata Santiago A.Carlos - *DSc*
UESC/DCAA

Roueda Abou Said - *DSc*
UESC/DCAA

ILHÉUS – BAHIA

2017

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família e aos meus filhos de penas e pelos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma maneira, colaboraram para a realização deste trabalho, e de forma particular:

À Fabiano Laranja Ribeiro pelo amor, carinho e dedicação durante todos esses anos.

As auxiliares de veterinária Jéssica Machado, Aline Biasutti, Suellen Boeck, Fernanda Quilles e as Médicas Veterinárias Dra Raíza Nadu e Dra Hegiany Bridi por todo apoio durante o período experimental e incentivo incondicional em todos os momentos.

À Professora Dra Paola Pereira das Neves Snoeck, pela valiosa orientação e ensinamentos, tanto acadêmicos, profissionais, quanto pessoais.

À Professora Fabiana Lessa Silva e à doutoranda Paula Brandão pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos laboratórios Cremasco e Idan pelas lâminas histopatológicas e análises laboratoriais.

À Mary Rocha e Douglas do Canil Stone Pet Center e Paulo do Canil Atlantic Valley pelo apoio operacional e por disponibilizar os animais para o estudo.

A todos os protetores independentes e proprietários particulares que disponibilizaram os cães para a pesquisa e deram todo suporte necessário na coleta de material e manuseio dos animais durante o experimento e no pós operatório.

A todos os professores e colegas do PPGCA/UDESC, que contribuíram para o meu crescimento acadêmico.

A todos o meu muito obrigada!

EFEITO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA (VITAMINA B6) NA INDUÇÃO DO ESTRO E NA PSEUDOGESTAÇÃO DE CADELAS

RESUMO

Avaliou-se a eficácia do cloridrato de piridoxina (vitamina B6) na indução de estro em cadelas em anestro (Experimento I), no controle da lactação de cadelas com pseudogestação e os efeitos colaterais associados a administração do fármaco (Experimento II). O Experimento I foi composto por 40 cadelas em anestro divididas em quatro grupos experimentais: piridoxina 10mg/kg/dia (G1), piridoxina 50mg/kg/dia (G2), cabergolina 5µg/kg/dia (G3) e placebo/controle (G4). O ciclo estral foi avaliado por citologia vaginal e análises hormonais (FSH, LH e PRL). Duas cadelas do G1, três do G2, todas do G3 e uma do G4 reestabeleceram a função gonadal e foram inseminadas. Apenas uma cadela do G1 e uma do G2 ficaram gestantes contra oito fêmeas do G3 e nenhuma do G4 ($P < 0,05$). As concentrações séricas de prolactina foram reduzidas pelo tratamento no G2 e G3 ($P < 0,05$). As demais avaliações hormonais não apresentaram diferença entre os grupos ($P > 0,05$). No Experimento II, foram selecionadas 40 cadelas em diestro não gestacional com queixa clínica de secreção láctea. Os grupos foram divididos conforme descrito no Experimento I. O G2 e o G3 foram igualmente eficientes ($P > 0,05$) na supressão da lactação e remissão do desenvolvimento mamário, diferenciando-se ($P < 0,05$) dos demais grupos em todas as semanas investigadas. Não foram observados efeitos colaterais associados à administração dos fármacos estudados. A vitamina B6 demonstrou ser uma alternativa segura e economicamente viável para interrupção da lactação em cadelas com pseudociese, mas não pode substituir a cabergolina em protocolos de indução de estro em cadelas no anestro.

Palavras-chave: Estro. Indução. Prolactina. Pseudociese. Vitamina B6

EFFECT OF PYRIDOXINE CHLORIDRATE (VITAMIN B6) IN THE INDUCTION OF ESTRO AND PSEUDOPREGNANCY IN FEMALE DOGS

ABSTRACT

The efficacy of pyridoxine chloridrate (vitamin B6) in the induction of estrus in female dogs in anestrus (Experiment I), control of lactation of female dogs with pseudopregnancy and the side effects associated with administration of the drugs was evaluated (Experiment II). Experiment I was composed of 40 female dogs in anestrus divided into four experimental groups: pyridoxine 10mg/kg/day (G1), pyridoxine 50mg/kg/day (G2), cabergoline 5 μ g/kg /day (G3) and placebo/control (G4). The estrous cycle was evaluated by vaginal cytology and hormonal analyzes (FSH, LH and PRL). Two female dogs (G1), three (G2), all from (G3) and one (G4) reestablished gonadal function and were inseminated. Only one G1 female and one G2 female were pregnant against eight G3 females and none G4 females ($P < 0.05$). Plasma concentrations of prolactin were reduced by treatment in G2 and G3 ($P < 0.05$). The other hormonal evaluations did not present alterations among the groups ($P > 0.05$). In Experiment II, 40 female dogs with pseudopregnancy and lactea secretion were selected. The groups were divided as described in Experiment I. G2 and G3 were equally efficient ($P > 0.05$) in lactation suppression and remission of breast development in this species, differing ($P < 0.05$) from the other groups in all the investigated weeks. There were no side effects associated with administration of the drugs studied. Vitamin B6 has been shown to be a safe and economically viable alternative for interruption of lactation in female dogs with pseudopregnancy, but should not replace cabergoline in protocols for induction of estrus in female dogs in anestrus.

Keywords: Estrus. Induction. Prolactin. Pseudociese. Vitamin B6

LISTA DE TABELAS

Tabela	EXPERIMENTO 1	Página
1	Parâmetros reprodutivos associados à administração de cloridrato de piridoxina (10mg/kg/dia ou 50mg/kg/dia) ou cabergolina (5µg/kg/dia) em cadelas no anestro (130-160 dias de anestro) e custo do tratamento.	28
2	Médias das concentrações séricas de PRL, LH e FSH dosadas em cadelas (130-160 dias de anestro) no dia zero (dia do início do tratamento, antes da primeira administração dos fármacos) e 120h após a administração de cloridrato de piridoxina ou cabergolina.	30

Tabela	EXPERIMENTO 2	Página
1	Número semanal (acumulado) de animais que manifestaram supressão da lactação com a utilização de piridoxina (10mg/kg/dia ou 50mg/kg/dia) ou de cabergolina (5µg/kg/dia) em cadelas com pseudociese.	41
2	Médias das concentrações séricas de PRL em cadelas com pseudociese no dia zero (dia do início do tratamento, antes da primeira administração dos fármacos) e 120h após a administração de cloridrato de piridoxina ou cabergolina.	41

SUMÁRIO

	Pag.
1	INTRODUÇÃO..... 10
2	OBJETIVO GERAL..... 11
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 11
3	REVISÃO DE LITERATURA..... 12
3.1	FISIOLOGIA E ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ESTRAL..... 12
3.2	REGULAÇÃO NEUROENDÓCRINA DA REPRODUÇÃO..... 15
3.3	INDUÇÃO DE ESTRO EM CADELAS..... 16
3.4	PSEUDOGESTAÇÃO CLÍNICA E FISIOLÓGICA EM CADELA... 18
3.4.1	Tratamento da pseudociese com inibidores de prolactina..... 20
4	ARTIGO I: O USO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA PARA INDUZIR ESTRO EM CADELAS..... 22
4.1	RESUMO..... 23
4.2	ABSTRACT..... 24
4.3	INTRODUÇÃO..... 24
4.4	MATERIAL E MÉTODOS..... 26
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 27
4.6	CONCLUSÃO..... 31
4.7	REFERÊNCIAS..... 32
5	ARTIGO II: USO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA NA INTERRUPÇÃO DA LACTAÇÃO EM CADELAS COM PSEUDOGESTAÇÃO..... 35
5.1	RESUMO..... 36
5.2	ABSTRACT..... 37
5.3	INTRODUÇÃO..... 37
5.4	MATERIAL E MÉTODOS..... 39
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 40
5.6	CONCLUSÃO..... 43
5.7	REFERÊNCIAS..... 44
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 46
7	REFERÊNCIAS..... 47
8	ANEXOS..... 55

1 INTRODUÇÃO

Os cães vêm se tornando uma espécie de grande importância na pesquisa científica por possuírem um grande valor afetivo e comercial, uma vez que é crescente o número de pessoas que possuem cães como animais de companhia, superando o número de crianças no Brasil (IBGE, 2013). Além disso, são considerados como modelo experimental para canídeos selvagens, fornecendo conhecimento e técnicas reprodutivas importantes para perpetuação de animais ameaçados de extinção.

As biotécnicas disponíveis à reprodução de cães ainda são pouco utilizadas e muito menos desenvolvidas quando comparadas às outras espécies domésticas, principalmente em função da singularidade da fisiologia dessa espécie (GOBELLO; CORRADA, 2003). A ovulação ocorre uma a duas vezes ao ano, seguida de uma fase luteínica semelhante entre indivíduos gestantes e não gestantes. Além disso, apresenta um longo e variável período de anestro fisiológico até o surgimento de um novo ciclo (CONCANNON, 1989a,1993; HOFFMANN *et al.*, 1996; RIJNBERK; KOOISTRA, 2010).

Durante o período de anestro, há atividade no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano (ETTINGER, 1992) com liberação e circulação de gonadotrofinas suficientes para o restabelecimento do ciclo estral. No entanto, há uma baixa responsividade ovariana aos estímulos hormonais nesse período (CONCANNON, *et al.*, 1989; CONCANNON, 2011). A prolactina (PRL) pode ser um dos hormônios responsáveis por essa baixa sensibilidade dos ovários, bem como pelo efeito inibidor sobre as gonadotrofinas (JEFFCOATE, 1993).

Os agonistas dopaminérgicos (ADs) são frequentemente usados para redução do intervalo interestro ou para induzir o estro em cadelas em anestro prolongado, por meio da inibição da síntese e/ou liberação de PRL (VERSTEGEN *et al.*, 1999; FIENI *et al.*, 1999; CIRIT *et al.*, 2007; AJITKUMAR *et al.*, 2010; AJITKUMAR; PRASEEDA, 2010). Além disso, os ADs também têm sido utilizados no tratamento dos sinais clínicos da pseudogestação (RIJNBERK; KOOISTRA, 2010), evidenciando a importância da PRL na etiopatogenia dessa síndrome que acomete cadelas em diestro não gestacional (GOBELLO *et al.*, 2001a,b,c).

O cloridrato de piridoxina (vitamina B6) possui um efeito dopaminérgico sobre o hipotálamo, inibindo a síntese e/ou secreção de PRL (PAPAVASILIOU

et al., 1972; FOUKAS, 1973; MARCUS, 1975; DELITALA *et al.*, 1976; MCINTOSH, 1976). Estudos realizados com mulheres lactantes demonstraram que a vitamina B6 foi capaz de reduzir os níveis de PRL e suprimir a lactação em 95% dos casos (FOUKAS, 1973). De forma semelhante, ratas tratadas com injeções de vitamina B6 também apresentaram redução nos níveis de PRL (HARRIS *et al.*, 1978).

O efeito do cloridrato de piridoxina sobre a supressão de PRL em cadelas, bem como a consequência sobre o ciclo reprodutivo e a lactação ainda não foram investigados. É possível que a piridoxina possa influenciar as concentrações séricas de PRL promovendo o restabelecimento da função gonadal no anestro, bem como ser efetiva no tratamento dos sinais clínicos da pseudogestação.

Tendo em vista os resultados promissores dos ADs na indução de estro fértil em cadelas e no tratamento da pseudociese, buscou-se investigar o efeito do cloridrato de piridoxina na indução de ciclos ovulatórios em cadelas no anestro (Experimento I), bem como sua influência sobre a concentração sérica de hormônios hipofisários (PRL, FSH, LH) e a remissão dos sinais clínicos da pseudociese nessa espécie (Experimento II).

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia do cloridrato de piridoxina na indução de ciclos ovulatórios e indução de cio férteis em cadelas no anestro, bem como verificar o efeito sobre a lactação na fase de diestro não gestacional nessa espécie.

2.1 Objetivos específicos

a) Verificar os efeitos do cloridrato de piridoxina sobre as concentrações séricas de hormônios hipofisários (PRL, FSH e LH) e o restabelecimento do ciclo estral;

b) Testar a fertilidade *in vivo* do estro induzido por cloridrato de piridoxina;

c) Avaliar o efeito do cloridrato de piridoxina no desenvolvimento mamário e secreção láctea de cadelas com pseudogestação;

d) Identificar possíveis alterações macroscópicas de útero e ovário e alterações histológicas uterinas associadas aos tratamentos com vitamina B6;

e) Verificar a manifestação de efeitos colaterais indesejáveis relacionados à administração de cloridrato de piridoxina;

f) Avaliar o custo/benefício do tratamento com a vitamina B6 em substituição à cabergolina.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fisiologia e endocrinologia do ciclo estral

As cadelas domésticas (*Canis familiaris*) são consideradas monoéstricas não sazonais, de ovulação espontânea, com a função lútea ativa por dois meses, mesmo na ausência de gestação (CONCANNON, 2011). Em média, apresentam dois ciclos ovulatórios por ano, seguidos por um longo período de quiescência (anestro) até o surgimento de um novo ciclo (CONCANNON, 1993; HOFFMANN *et al.*, 1996; GOBELLO; CORRADA, 2003). Os intervalos interestrals normalmente variam entre cinco e 11 meses (CONCANNON, 1993; 2011).

A idade à puberdade em cadelas é muito variável, não somente entre raças, como também entre indivíduos de mesma raça. O primeiro proestro pode ocorrer entre seis e 13 meses de idade (CONCANNON, 2011). Cadelas de grande porte podem manifestar o primeiro ciclo estral entre 18 e 24 meses (FELDMAN; NELSON, 2004).

O ciclo estral canino é dividido em fase folicular (proestro), fase luteínica (estro/diestro) e quiescência (anestro). A fase folicular tem início com o aumento da concentração de GnRH que, por sua vez, estimula a elevação dos níveis de LH pulsátil e FSH necessários para o desenvolvimento folicular. Nesse período, os níveis de estrógeno se elevam em decorrência do recrutamento de folículos antrais em resposta ao aumento de FSH, dando início ao proestro (FELDMAN; NELSON, 2004; CONCANNON *et al.*, 2009).

O proestro possui duração de cinco a 20 dias. Caracteriza-se pela hipertrofia e turgidez da vulva e do estroma vaginal, geralmente acompanhado de descarga serosanguinolenta causada por diapedese eritrocitária através dos capilares uterinos. A liberação de feromônios causa atração de machos, sem permissão de cópula (FELDMAN; NELSON, 2004; CONCANNON, 2011).

As concentrações crescentes de estradiol durante o proestro estimulam o desenvolvimento de ductos e túbulos das glândulas mamárias, o

espessamento da tuba uterina e do endométrio, o aumento da atividade miometrial e o alargamento da cérvix (FELDMAN; NELSON, 2004). Há também uma progressiva proliferação e cornificação do epitélio vaginal sob influência do aumento das concentrações de estradiol sérico, sintetizado pelas células da granulosa dos folículos em desenvolvimento (FELDMAN; NELSON, 2004; CONCANNON, 2011).

A receptividade da cadela inicia com o declínio do estradiol e o aumento da progesterona no fim da fase folicular, o que é característico dessa espécie. Essa mudança no perfil hormonal acontece em virtude da luteinização dos folículos maduros, por influência da onda pré-ovulatória de LH, e pode ser detectada até quatro dias antes do início do estro nessa espécie (CONCANNON *et al.*, 1977).

O estro na cadela é caracterizado pela receptividade da fêmea ao macho e aceitação de cópula, com duração média de cinco a 10 dias (CONCANNON, 2011). Normalmente, nessa fase a secreção vaginal passa de sanguinolenta a transparente e a vulva torna-se flácida e pálida, embora ainda edemaciada (FELDMAN; NELSON, 2004).

A ovulação ocorre espontaneamente cerca de 24-72h após o pico de LH (CONCANNON *et al.*, 1975; CONCANNON *et al.*, 1977; LINDSAY; JEFFCOATE, 1993) e os oócitos primários completam sua primeira divisão meiótica em até cinco dias após a ovulação (HOLST; PHEMISTER, 1971; MAHI; YANAGIMACHI, 1976, TSUITSUI, 1988; YAMADA *et al.*, 1992). Após a maturação nas tubas uterinas, os oócitos podem permanecer fertilizáveis por um período de dois a oito dias (TSUITSUI, 1988).

A formação do corpo lúteo (CL) em cadelas inicia-se antes da ovulação, com o processo de luteinização das células foliculares (CONCANNON *et al.*, 1977; CONCANNON, 2011). No diestro não gestacional, bem como na gestação, os corpos lúteos são capazes de manter altas concentrações de progesterona, geralmente por 50-60 dias após o pico pré-ovulatório de LH, sendo necessário suporte hipofisário de LH e altas concentrações de PRL para que haja manutenção funcional do corpo lúteo (CONCANNON *et al.*, 1989).

O diestro da cadela pode durar de 50 a 80 dias e é caracterizado pelo fim da receptividade e diminuição da atração ao macho (CONCANNON, 2011). Há visível redução do edema vulvar e da secreção vaginal. Nesta fase, as

concentrações séricas de progesterona variam entre 15-90ng/mL (CONCANNON *et al.*, 1989) alcançando valores máximos entre 20 e 30 dias após a ovulação (CONCANNON *et al.*, 1975). Modificações uterinas (estrutura glandular e vascularização) ocorrem em resposta ao aumento da concentração de progesterona estando, dessa forma, presentes tanto em cadelas gestantes quanto não gestantes. A PRL eleva-se na segunda metade da gestação e atinge o pico máximo no parto (CONCANNON, 2011).

A principal função da PRL em mamíferos é estimular o desenvolvimento mamário e sua atividade secretória (DE COSTER *et al.*, 1983) mas, em cadelas, a PRL também possui atividade luteotrófica (ONCLIN *et al.*, 1993, RIJNBERK; KOOISTRA, 2010; CANCONNAN, 2011), sendo o principal fator responsável pela manutenção do corpo lúteo na segunda metade da fase luteal (OKKENS *et al.*, 1990; RIJNBERK; KOOISTRA, 2010; CONCANNON, 2011).

O fim do diestro ocorre abruptamente com o parto, cerca de 64 a 66 dias após o pico de LH com perda da função luteal. Já nas cadelas não gestantes, essa mudança de fase é mais lenta, podendo durar até 100 dias, quando a concentração de progesterona atinge valores menores que 1,0ng/mL (ONCLIN; VERSTEGEN, 1997; FELDMAN; NELSON, 2004; HOFFMANN *et al.*, 2004). O endométrio inicia então um processo de reparação, que requer um a três meses para estar completo, sendo considerado um fator determinante para o longo período de anestro na cadela (FELDMAN; NELSON, 2004).

Os mecanismos de luteólise na cadela ainda não são bem esclarecidos. Acredita-se que o útero não exerça efeito sobre a função luteal, uma vez que a histerectomia não é capaz de prolongar a atividade do corpo lúteo (OKKENS *et al.*, 1985, CONCANNON, 2011).

O anestro é caracterizado pela inatividade sexual, importante para o restabelecimento endometrial e preparação para um novo ciclo estral (FELDMAN; NELSON, 2004) e, embora haja atividade no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, a responsividade dos ovários às gonadotrofinas é insuficiente para dar início a um próximo ciclo (CONCANNON, *et al.*, 1989; CONCANNON, 2011).

A duração do anestro pode variar de três a 10 meses entre animais e até mesmo entre ciclos de uma mesma cadela (CONCANNON, 1993; VERSTEGEN *et al.*, 1999) e depende parcialmente da duração da fase luteal.

Os agonistas dopaminérgicos causam luteólise após 30 dias da ovulação, por inibição da síntese de prolactina (ONCLIN *et al.*, 1993). Eles são utilizados em cadelas em diferentes estágios do anestro com intuito de reduzir o período de inatividade sexual mediado por prolactina (JOCHLE *et al.*, 1988; ONCLIN; VERSTEGEN, 1997; VERSTEGEN *et al.*, 1999; AJITKUMAR *et al.*, 2010; AJITKUMAR; PRASEEDA, 2010, NAK *et al.*, 2012).

As concentrações de progesterona e estrógeno no anestro atingem valores basais, enquanto as concentrações de FSH geralmente estão aumentadas. Os níveis de LH são menores que em outras fases do ciclo, com pulsos a cada oito a 12 horas (CONCANNON, 2005).

3.2 Regulação neuroendócrina da reprodução

O sistema endócrino utiliza mensageiros químicos (hormônios) na regulação dos processos reprodutivos, provenientes de várias áreas do hipotálamo, dos lobos anteriores e posteriores da hipófise (adenohipófise e neurohipófise), das gônadas (ovários e testículos), útero e placenta. O eixo hipotalâmico-hipofisário é a unidade funcional de integração do sistema nervoso e endócrino, que regula importantes funções metabólicas como o crescimento e a reprodução. Os hormônios secretados pelas células nervosas do hipotálamo são conhecidos como transdutores neuroendócrinos, pois transformam impulsos nervosos em sinais hormonais (CUNNINGHAN; KLEIN, 1999).

Os hormônios hipotalâmicos que regulam a reprodução são o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), o fator inibidor de prolactina (PIF), fator liberador de prolactina (PRF) e o hormônio liberador de tireotrofina (TRH). O GnRH é um decapeptídeo que, quando liberado no sistema portahipotalâmico-hipofisário, atua na adenohipófise, promovendo a liberação das gonadotrofinas hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), que também sofrem regulação por esteroides gonadais (estrógeno, progesterona e testosterona) (CUNNINGHAN; KLEIN 1999; RIJNBERK; KOOISTRA, 2010). Os hormônios PRF (ex. peptídeo vasoativo intestinal) e PIF (ex. dopamina) controlam a biossíntese e a secreção de PRL, enquanto o TRH age na hipófise estimulando a liberação de tireotrofina (TSH) que, por sua vez, estimula também a secreção de PRL (MACLEOD; LEHMEYER, 1974; BLAKE, 1976).

A PRL é um hormônio produzido principalmente pelos lactotrófos da adenohipófise, além de ser produzida por tecidos linfóides, endométrio e placenta. A secreção basal de PRL ocorre de forma cíclica com valores mais altos nas primeiras horas do dia. Acredita-se que o principal mecanismo envolvido nesse ciclo é a alteração no tônus dopaminérgico influenciado pela presença de luz (VELDMAN *et al.*, 2001). Os níveis séricos de PRL nem sempre se correlacionam com achados clínicos, uma vez que as moléculas circulantes podem variar em tamanho, peso molecular e afinidade com os receptores (GOBELLO *et al.*, 2001a,d).

A PRL, o estrógeno e a progesterona atuam diretamente na proliferação, diferenciação e preparação do endométrio, objetivando a implantação embrionária. Nos ovários, a PRL atua na manutenção dos corpos lúteos (OKKENS *et al.*, 1990) e também possui um papel fundamental na fisiopatologia da pseudogestação canina, mas sua atuação ainda não é bem compreendida (GOBELLO *et al.*, 2001c).

O hipotálamo regula de forma tônica a secreção de PRL pela adenohipófise. A dopamina, principal fator inibidor de prolactina (PIF), é sintetizada nos axônios dos neurônios tuberoinfundibulares e liberada na circulação porta-hipofisária. Além de controlar a secreção de PRL por meio da ligação a receptores D2 das membranas dos lactotrófos (RIJNBERK; KOOISTRA, 2010), a dopamina e os ADs parecem desempenhar uma importante função na proliferação das células lactotróficas (ASA *et al.*, 1999) e na regulação da transcrição do gene da PRL (DAY *et al.*, 1998). Já o aumento da PRL pode ocorrer por meio da inibição dos PIFs ou da liberação de PRFs. Os PRFs mais importantes são o TRH, a ocitocina e o polipeptídeo vasoativo intestinal (RIJNBERK; KOOISTRA, 2010).

3.3 Indução de estro em cadelas

A indução de estro é uma biotécnica extremamente útil no manejo reprodutivo de cadelas, uma vez que possibilita a sincronização dosaios e a concentração dos nascimentos em uma determinada época do ano, ajustando os nascimentos ao calendário do proprietário ou à disponibilidade do reprodutor ou sêmen (CONCANNON, 2005). Além disso, permite a redução do intervalo

interestro, aumentando o número de filhotes por fêmeas em idade reprodutiva (AJITKUMAR *et al.*, 2010; AJITKUMAR; PRASEEDA, 2010).

A sincronização do ciclo estral é necessária para a aplicação de qualquer método de reprodução assistida para conservação de espécies sob ameaça de extinção (GOBELLO; CORRADA, 2003). A ausência de protocolos de sincronização de ovulação confiáveis é o principal entrave nos protocolos de transferência de embriões caninos (FARSTAD, 2000). Diversos tratamentos foram testados em cadelas, mas a fertilidade induzida é muito variável e os custos bem elevados (KUTZLER, 2005), o que desestimula a utilização dessa biotécnica na rotina reprodutiva.

Diversos protocolos farmacológicos de indução de estro foram exaustivamente testados nas mais variadas espécies, embora existam poucos estudos com cadelas, comparado a outras espécies domésticas, e raras formulações especificamente desenvolvidas ou aprovadas para uso em cães (GOBELLO, 2000; 2006). A maior parte dos protocolos é pouco prática e onerosa, sendo considerada inapropriada por muitos pesquisadores para utilização em cadelas com atividade cíclica normal (CONCANNON, 2005).

Uma variedade de hormônios exógenos e suas combinações foram testadas com o objetivo de induzir o estro em cadelas. As gonadotrofinas são utilizadas para estimular o desenvolvimento folicular e incluem o uso de LH, FSH, gonadotrofina coriônica equina (eCG), gonadotrofina coriônica humana (hCG) e gonadotrofina menopáusicas humana (hMG) (CONCANNON, 1993; SHILLE *et al.*, 1984; VAN HAAFTEN *et al.*, 1989; VERSTEGEN *et al.*, 1997; WANKE *et al.*, 1997). Os protocolos com a utilização de GnRH ou análogos (VANDERLIP *et al.*, 1987) visam estimular a liberação endógena de gonadotrofinas e, conseqüentemente, induzir estros férteis (CONCANNON, 1989b; VOLKMANN *et al.*, 2006). Já os agonistas dopaminérgicos, são frequentemente usados para redução do intervalo interestro ou para induzir o estro em cadelas em anestro prolongado, por meio da inibição da síntese e/ou liberação de prolactina (PRL) (VERSTEGEN *et al.*, 1999; FIENI *et al.*, 1999; CIRIT *et al.*, 2007; AJITKUMAR *et al.*, 2010; AJITKUMAR; PRASEEDA, 2010).

A vitamina B6 foi relatada como fármaco capaz de interferir na lactação de mulheres no pós-parto (FOUKAS, 1973; MARCUS, 1975) e na concentração sérica de PRL em indivíduos clinicamente normais (DELITALA *et al.*, 1976) e

em pacientes com síndrome da galactorréia-amenorréia (DELITALA *et al.*, 1976; MACINTOSH, 1976). Estudos *in vitro* mostraram que a vitamina B6 é capaz de inibir parcialmente a liberação de PRL em culturas de tecidos hipofisários de ratos por ação direta, ou seja, sem interferência da dopamina (MACLEOD; LEHMEYER, 1974). No entanto, também tem sido relatada como cofator na descarboxilação periférica da L-dopa para dopamina no hipotálamo (FOUKAS, 1973; MARCUS, 1975; DELITALA *et al.*, 1976; MACINTOSH, 1976). A inibição da síntese e/ou liberação de PRL e indução de estro por ação da vitamina B6 em cadelas ainda não foram investigadas.

3.4 Pseudogestação clínica e fisiológica em cadelas

A pseudogestação clínica é uma síndrome que acomete cadelas não gestantes e é caracterizada por sinais como comportamento materno, ganho de peso, hiperplasia mamária e lactação (GRÜNAU *et al.*, 1996). Também conhecida como pseudociese ou “falsa gestação”, essa síndrome ocorre tipicamente em cadelas em diestro não gestacional com incidência estimada de 50-75% (JOHNSTON, 1986). É provável que a produção de leite por animais não gestantes represente uma adaptação evolutiva de espécies caninas primitivas, já que fêmeas não paridas poderiam ajudar na amamentação das crias do bando (JÖCHLE *et al.*, 1987; VOITH, 1980).

A fase lútea de cadelas clinicamente saudáveis e não gestantes tem sido denominada pseudogestação fisiológica ou silenciosa. O desenvolvimento mamário durante essa fase varia entre as cadelas e, quando essa modificação resulta em alterações extremas, semelhante à observada no final da gravidez ou no período pós-parto, é considerado como problema clínico e denominado pseudogestação clínica ou pseudociese (ALLEN, 1986).

A PRL parece desempenhar um papel fundamental na fisiopatologia da pseudogestação, mas sua atuação nesse processo ainda não é completamente compreendida (GRÜNAU *et al.*, 1996). Alguns estudos sugerem que as concentrações de PRL circulantes em cadelas com pseudociese são mais elevadas quando comparadas com cadelas não afetadas avaliadas no diestro e na ausência de gestação (OKKENS *et al.*, 1997). No entanto, existem trabalhos que demonstraram uma falta de consistência entre os níveis de PRL e a intensidade dos sinais clínicos da pseudociese (HOFFMANN *et al.*, 1992;

HARVEY *et al.*, 1997; 1999). É possível que diferenças individuais na sensibilidade periférica à PRL, ou mesmo a existência de diferentes formas moleculares de PRL canina, com diferentes bioatividades estejam envolvidas na variação da incidência e gravidade dessa síndrome (GOBELO *et al.*, 2001a,d).

A exposição à progesterona e subsequente retirada abrupta e anormal está aparentemente envolvida no desencadeamento da pseudogestação (GOBELLO, *et al.*, 2001a,b). As concentrações aumentadas de prolactina ou uma sensibilidade aumentada à prolactina podem ser induzidas por um declínio mais rápido que o normal dos níveis de progesterona (SMITH; MCDONALD, 1974; CONCANNON, 1989a), semelhante à pseudogestação induzida por castração quando esta é realizada na fase lútea tardia (CONCANNON, 1989a). No entanto, nem todas as cadelas ovariectomizadas no diestro manifestam sinais clínicos da pseudogestação (GOBELLO *et al.*, 2001b), demonstrando que algumas cadelas são mais sensíveis aos efeitos da retirada da progesterona do que outras, o que pode explicar a incidência variável de pseudogestação entre indivíduos e, possivelmente, entre raças.

O hormônio do crescimento (GH) desempenha um importante papel na mamogênese em muitas espécies de mamíferos. No entanto, não há evidências que comprovem a relação do GH com a pseudogestação canina, apesar de terem sido observadas associações entre os níveis séricos de GH e a pseudociese (HOFFMANN *et al.*, 1992).

A remissão dos sinais clínicos da pseudogestação geralmente acontece de forma espontânea (GOBELLO *et al.*, 2001a,b). No entanto, as alterações físicas e comportamentais, quando exacerbadas, podem gerar desconforto ao animal e a seus proprietários, além de ser um fator de risco para o desenvolvimento de tumores mamários pela distensão mecânica sucessiva e acúmulo de substâncias carcinogênicas no interior dos ácinos mamários pela retenção de leite (MURRELL, 1991).

Os tratamentos da pseudociese canina pela inibição da liberação de PRL com derivados do ergot (bromocriptina, cabergolina e metergolina) apresentam resultados satisfatórios, embora possam apresentar efeitos colaterais indesejáveis como vômitos, hiperexcitação, agressividade, dentre

outros (GOBELLO, 2000; GOBELLO *et al.*, 2001a,b; RIJNBERK; KOOISTRA, 2010).

As cadelas com predisposição ao desenvolvimento da pseudogestação não devem ser destinadas à reprodução e devem ser submetidas à ovariectomia/ovariosalpingohisterectomia como medida preventiva, pois apresentam taxa de recorrência elevada em sucessivos ciclos estrais (JOHNSTON, 1986).

3.4.1 Tratamento da pseudociese com inibidores de prolactina

Os alcaloides derivados do ergot revolucionaram o tratamento da pseudociese canina por atuarem na inibição da secreção de PRL por meio da regulação dopaminérgica e serotoninérgica (THORNER, 1998). A cabergolina é o agonista dopaminérgico mais utilizado para inibir a secreção de PRL em cadelas, pois possui ação direta sobre os receptores D2-dopaminérgicos das células lactotróficas da adenohipófise. Já a metergolina é um antagonista da serotonina e, portanto, tem um efeito dopaminérgico, reduzindo a secreção de PRL quando administrada em altas doses (JANSSENS, 1986; RIJNBERK; KOOISTRA, 2010).

A bromocriptina é um agonista dopaminérgico que não possui apresentação comercial para uso veterinário, mas é utilizada experimentalmente desde a década de 80 em pesquisas com animais. Os protocolos terapêuticos utilizam doses que variam de 10 a 100µg/kg/dia durante 10 a 14 dias (JANSSENS, 1986). Uma das desvantagens desse fármaco é a meia-vida plasmática curta (4-6h), necessitando ser administrado pelo menos duas vezes por dia para garantir a eficácia. Além disso, a bromocriptina também possui atividade sobre receptores GABA, serotoninérgicos e adrenérgicos, o que a torna menos específica que a cabergolina, além de atravessar a barreira hematoencefálica e apresentar efeitos colaterais como vômitos, anorexia e depressão (GOBELLO, 2000; GOBELLO *et al.*, 2001a,b).

A cabergolina possui maior bioatividade e especificidade para o receptor D2, além de maior tempo de ação (meia-vida) em relação à bromocriptina. Essas características garantem eficácia com administração em dose única diária e menos efeitos colaterais comparados a outros derivados de ergot

(JÖCHLE *et al.*, 1987; HARVEY *et al.*, 1997) e raras manifestações gastrointestinais (FIENI *et al.*, 1999). A apresentação comercial veterinária (Galastop®) está disponível em países da Europa, com indicação para tratamento de pseudociese por via oral na dose de 5µg/kg/dia durante 5 a 10 dias.

A metergolina é um medicamento antagonista serotoninérgico que é comercializado no Brasil para o tratamento da pseudociese em cadelas (Contralac®). Ela possui uma meia-vida curta e por isso necessita ser administrada duas vezes por dia. A dose recomendada é de 0,1 mg/kg, por via oral, duas vezes por dia, durante oito a 10 dias. Agressividade, hiperexcitação e vocalização são os efeitos colaterais mais frequentemente relatados após a administração da metergolina (HAMON *et al.*, 1981; FIENI *et al.*, 1999).

O cloridrato de piridoxina (vitamina B6) demonstrou ser eficiente na supressão da lactação em mulheres e ratas, com redução dos níveis séricos de PRL (FOUKAS, 1973; HARRIS *et al.*, 1978), sugerindo um efeito dopaminérgico da piridoxina sobre o hipotálamo. Em cães, a vitamina B6 pode ser utilizada na dose de 50 mg/kg/dia por até 107 dias sem sinais clínicos de toxicidade (PHILLIPS *et al.*, 1978). Doses mais elevadas (150 mg/kg/dia) por um longo período de tratamento (100 a 120 dias) podem induzir quadros de neurotoxicidade subaguda (HOOVER; CARLTON, 1981). Os efeitos da vitamina B6 sobre os sinais da pseudogestação em cadelas ainda não foram investigados.

4. ARTIGO CIENTÍFICO I

**O USO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA PARA INDUZIR ESTRO EM
CADELAS DA RAÇA BULLDOG FRANCÊS**

**O uso do cloridrato de piridoxina para induzir estro em cadelas da raça Bulldog
Francês**

*[The use of pyridoxine chloridrate to induce estrus in female dogs of the French
Bulldog breed]*

M.C.Silva^{1*}, P.P.N.Snoeck¹

¹Programa de Pós-Graduação Ciência Animal (PPGCA), Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, Brasil.

* E-mail: maira_corona@hotmail.com

RESUMO

Os agonistas dopaminérgicos são utilizados para induzir estro em cadelas, pois atuam na síntese e liberação de prolactina. Objetivou-se avaliar o efeito da piridoxina como indutor de estro em cadelas por agir na neurotransmissão dopaminérgica. Foram selecionadas 40 cadelas em anestro, divididas em quatro grupos experimentais, tratadas com 10mg/kg/dia (G1) e 50mg/kg/dia (G2) de cloridrato de piridoxina, 5µg/kg/dia (G3) de cabergolina e grupo controle/placebo (G4) por até 20 dias. Foram realizadas citologias vaginais a cada 24h para acompanhamento do ciclo estral e análises hormonais (FSH, LH e PRL) no dia zero e 120h do início do tratamento. As cadelas do G3 (100%) manifestaram proestro após 12 dias de tratamento aproximadamente, tempo inferior aos demais grupos ($P<0,05$). Apenas uma cadela do G1 e uma do G2 ficaram gestantes contra oito fêmeas do G3 e nenhuma do G4 ($P<0,05$). As concentrações séricas de prolactina foram reduzidas nas fêmeas do G2 e G3 ($P<0,05$). As demais avaliações hormonais não sofreram influência do tratamento ($P>0,05$). O cloridrato de piridoxina foi ineficiente para induzir estro em cadelas, mas foi capaz de suprimir a prolactina, de forma semelhante à cabergolina, quando utilizado na dose de 50mg/kg/dia.

Palavras-chave: agonista dopaminérgico, anestro, prolactina, vitamina B6

ABSTRACT

Dopaminergic agonists are used to induce estrus in female dogs as they act in the synthesis and release of prolactin. The objective of this study was to evaluate the effect of pyridoxine as an inducer of estrus by acting on dopaminergic neurotransmission. A total of 40 female dogs in anestrus were divided into four experimental groups treated with 10mg/kg/day (G1) and 50mg/kg/day (G2) of pyridoxine hydrochloride, 5µg/kg/day (G3) of cabergoline and control group/placebo (G4) for up to 20 days. Vaginal cytologies were performed every 24h for follow-up of the estrous cycle and hormonal analyzes (FSH, LH and PRL) on day zero and 120 hours after the start of treatment. The female dogs from G3 (100%) showed proestrus after 12 days of treatment, less time to the other groups ($P<0.05$). Only one female from G1 and one from G2 were pregnant against eight from G3 and none from G4 ($P<0.05$). Plasma concentrations of prolactin were reduced by treatment in females from G2 and G3 ($P<0.05$). The other hormonal evaluations were not influenced by the treatment ($P>0.05$). Pyridoxine chloridrate was inefficient to induce estrus in female dogs but was able to suppress prolactin when used at a dose of 50mg/kg/day.

Keywords: dopaminergic agonist, anestrus, prolactin, vitamin B6

INTRODUÇÃO

As cadelas domésticas (*Canis familiaris*) são consideradas monoéstricas não sazonais de ovulação espontânea. Em média, apresentam dois ciclos ovulatórios por ano, seguidos por uma fase lútea com duração média de dois meses, mesmo na ausência de gestação (Sokolowski *et al.*, 1977; Concannon, 2011, Kowalewski, 2017). O fim da fase luteínica é caracterizado pela perda da função luteal (luteólise) e, embora haja atividade no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, a responsividade dos ovários às gonadotrofinas é insuficiente para dar início a um próximo ciclo e o animal apresenta um estágio de inatividade sexual prolongado (Concannon, 2011; Kowalewski, 2017).

A indução de estro tem sido utilizada como forma de melhorar a eficiência reprodutiva de cadelas. Os agonistas dopaminérgicos (ADs) são frequentemente usados para redução do intervalo interestro ou para induzir o estro em cadelas com anestro

prolongado, por meio da inibição da síntese e/ou liberação de prolactina (PRL) (Concannon, 1993; Verstegen *et al.*, 1999; Ajitkumar e Praseeda, 2010; Antonov e Georgiev, 2015). A cabergolina é um agonista dopaminérgico ergolíneo comumente utilizado em cadelas na dose de 5µg/kg/dia, em diferentes estágios do anestro, com intuito de reduzir o período de inatividade sexual mediado pela PRL (Onclin e Verstegen, 1997; Verstegen *et al.*, 1999; Concannon, 1993; Ajitkumar e Praseeda, 2010; Nak *et al.*, 2012; Shinde *et al.*, 2014, Mogheiseh *et al.*, 2017), uma vez que a PRL além de estimular e manter a lactação em mamíferos, também desempenha um papel fundamental no controle da função ovariana, regulando os mecanismos de desencadeamento do estro (Gobello, 2000; Concannon, 2011).

O cloridrato de piridoxina (vitamina B6), por sua vez, atua na síntese e secreção de PRL (Papavasiliou *et al.*, 1972; Foukas, 1973; Marcus, 1975; Delitala *et al.*, 1976; McIntosh, 1976) como cofator na descarboxilação de L-DOPA (levodopa) em dopamina no hipotálamo (Delitala *et al.*, 1976; Bruice, 2006). Estudos realizados com mulheres lactantes tratadas com 200mg de piridoxina demonstraram que essa vitamina foi capaz de reduzir os níveis de PRL e suprimir a lactação em 95% dos casos (Foukas, 1973). De forma semelhante, ratas tratadas com injeções de vitamina B6 (50mg) também apresentaram redução nos níveis de PRL (Harris *et al.*, 1978), sugerindo um efeito dopaminérgico da piridoxina sobre o hipotálamo (Delitala *et al.*, 1976). Em cães, a vitamina B6 pode ser utilizada na dose de 50mg/kg/dia por até 107 dias sem sinais clínicos de toxicidade (Phillips *et al.*, 1978). Doses mais elevadas (150mg/kg/dia) por um longo período de tratamento (100 a 120 dias) podem induzir quadros de neurotoxicidade subaguda, com sinais clínicos de perda proprioceptiva, envolvendo ambos os lados e membros anteriores e posteriores, caracterizados por movimentos rígidos, espásticos e dismétricos (Hoover e Carlton, 1981).

O efeito da vitamina B6 sobre a supressão de PRL em cadelas, bem como o seu efeito sobre o ciclo reprodutivo nessa espécie, ainda não foram investigados. É possível que o cloridrato de piridoxina possua uma atividade dopaminérgica, influenciando nas concentrações séricas de PRL e, dessa forma, possa ser uma alternativa no auxílio do controle reprodutivo em cães, além de um agente potencial no tratamento da lactação na pseudociese. Desta forma, buscou-se investigar o efeito do cloridrato de piridoxina na restauração de ciclos ovulatórios em cadelas no anestro, bem como sua influência sobre a concentração de prolactina nessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 40 cadelas bulldog francês, raça que possui limitações anatômicas, necessitando frequentemente de inseminação artificial para a reprodução. Os animais era de dois canis distintos, com manejos semelhantes e localizados na mesma região. Os animais possuíam entre dois e seis anos de idade, com peso variando entre oito e 12 quilos, eram clinicamente saudáveis, vacinados e vermifugados. Durante o período experimental, os animais permaneceram alojados em baias com dois a três animais, com uma área coletiva de recreação e banho de sol. A alimentação era fornecida duas vezes ao dia com ração comercial seca (Farmina Pet Foods®) em quantidade adequada para manutenção do peso corporal e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, cada um com 10 animais em estágio de anestro intermediário (130-160 dias de anestro) (Verstegen *et al*, 1999) e com nível de progesterona sérica inferior a 1ng/mL. Os fármacos foram administrados diariamente por via oral em forma de cápsulas manipuladas (Vida Animal®) até 3 dias após a manifestação do proestro ou por um período máximo de 20 dias. O grupo 1 (G1) recebeu cloridrato de piridoxina 10mg/kg/dia, o grupo 2 (G2) cloridrato de piridoxina 50mg/kg/dia, o grupo 3 (G3-controle positivo) cabergolina 5µg/kg/dia e o grupo controle (G4-controle negativo) placebo (cápsulas vazias).

O ciclo estral durante o período de tratamento foi acompanhado por meio de citologia vaginal feita a cada 72h, com o intuito de verificar o início do proestro, seguidas de avaliações a cada 24h para identificar o final do proestro. As cadelas que responderam ao tratamento foram submetidas à inseminação artificial em fundo de vagina, com sêmen fresco (350×10^6 espermatozoides progressivamente móveis/dose inseminante), quando apresentaram o índice de células superficiais anucleadas superior a 80% (Feldman e Nelson, 2004). As inseminações foram feitas a cada 48h até o final do estro, definido pela alteração no padrão celular do epitélio vaginal e pela onda leucocitária.

O diagnóstico de gestação por ultrassonografia foi realizado 25 dias após a primeira inseminação e, as cadelas que apresentaram prenhez positiva, foram acompanhadas até o parto para registro do tamanho da ninhada. As fêmeas que não responderam ao tratamento foram acompanhadas, semanalmente, por meio de citologia vaginal e pela manifestação de sinais clínicos de proestro (secreção vaginal sanguinolenta, edema

vulvar e atração de machos) para registro do retorno da ciclicidade e definição do intervalo interestro.

Foram realizadas dosagens de prolactina, LH e FSH pela manhã (7h), duas horas antes da administração dos tratamentos (dia zero) e 120h após o início do tratamento, a fim de verificar possíveis estímulos à liberação de hormônios hipofisários por influência da piridoxina e/ou da cabergolina. Foi definido o tempo de 120h para a segunda dosagem de hormônios hipofisários, uma vez que alterações nas concentrações de prolactina já podem ser notadas a partir de 48h após administração oral de cabergolina em cadelas (Verstegen *et al.*, 1999) e até 1100h após a administração de vitamina B6 em dose única em ratas (Harris *et al.*, 1978). As análises foram realizadas no Instituto de Diagnóstico Animal (IDAN[®]), com a utilização do método de quimioluminescência para avaliações de PRL, LH e FSH, e radioimunoensaio para análise de progesterona, realizadas na seleção dos animais para formação dos grupos experimentais. As amostras de sangue (5mL) foram obtidas por punção venosa jugular em tubos de coleta de sangue à vácuo, com ativador de coágulo, centrifugadas a 3000 rpm durante 7 min, aliqüotadas em tubos de microcentrífuga (500 µL) e armazenadas a -20 ° C até a realização das análises.

Para comparação dentro de um mesmo grupo foi aplicado o teste de Wilcoxon para dados pareados. Para comparações antes e depois de cada tratamento entre os grupos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Já para avaliar as informações relativas ao efeito do tratamento foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com desdobramentos via comparações múltiplas de Dunn em variáveis quantitativas e teste Exato de Fisher para independência entre variáveis qualitativas (Milone, 2004; Lehmann e D'Abrera 2006). As variáveis hormonais foram comparadas por meio de média, desvio padrão e via teste de hipótese, ao nível de significância de $P < 0,05$.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEUA-UDESC) sob o n. 036/2015.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fêmeas dos grupos G1, G2 e G4 sofreram variada influência na interrupção do repouso sexual. Duas cadelas do G1 (10mg de B6/kg/dia), três do G2 (50mg de B6 /kg/dia) e uma do G4 (placebo) manifestaram proestro/estro durante o período de tratamento. As cadelas tratadas com cabergolina (G3) manifestaram proestro após $12,3 \pm 1,7$ dias de administração do fármaco, tempo inferior aos demais grupos ($P < 0,05$). Todas as fêmeas do G3 apresentaram alteração no padrão celular na citologia vaginal

esfoliativa, com aumento gradativo de células intermediárias pequenas e grandes. Também houve alterações físicas e/ou comportamentais como hipertrofia e turgidez da vulva, descarga serossanguinolenta e atração de machos em todas as cadelas tratadas com cabergolina ($P < 0,05$).

Diversos fatores podem ter contribuído para a indução do ciclo estral nas cadelas tratadas com piridoxina e placebo. É possível que a proximidade com outras fêmeas em estro (feromônios naturais) tenha colaborado para a interrupção do anestro por meio de estímulos sensoriais ou por interações sociais de dominância entre os grupos de fêmeas na presença do macho (Verstegen *et al.*, 1999; Concannon, 2011). Além disso, o período correspondente ao anestro canino pode variar de 60 a 300 dias entre cadelas ou, até mesmo, para a mesma cadela em ciclos distintos (Sokolowski *et al.*, 1977; Concannon, 1993; Concannon, 2011). As cadelas do experimento encontravam-se em anestro intermediário (130-160 dias de anestro), período em que algumas fêmeas podem interromper naturalmente o repouso sexual (Verstegen *et al.*, 1999; Concannon, 2011).

A duração do período de proestro e do estro não variou entre as fêmeas de grupos experimentais distintos. No entanto, a cabergolina (G3) foi o único tratamento capaz de influenciar 100% na atividade reprodutiva das cadelas (10 cadelas tratadas e 10 cadelas no estro) (Tab. 1).

Tabela 1. Parâmetros reprodutivos associados à administração de cloridrato de piridoxina (10mg de B6/kg/dia ou 50mg de B6/kg/dia) ou cabergolina (5µg/kg/dia) em cadelas no anestro (130-160 dias de anestro) e custo do tratamento.

Parâmetros	Tratamento			
	G1	G2	G3	G4
Animais que responderam ao tratamento (n)	2/10 ^a	3/10 ^a	10/10 ^b	1/10 ^a
Início do proestro (dias)	19,9±0,3 ^a	19,8±0,4 ^a	12,3±1,7 ^b	20±0,0 ^a
Duração do proestro (dias)	7,5±0,7	7,7±0,6	6,4±0,7	8,0
Duração do estro (dias)	8,5±0,7	9,3±0,6	7,9±0,6	9,0
Cadelas gestantes (n)	1 ^a	1 ^a	8 ^b	0 ^a
Total de crias (n)	4 ^a	3 ^a	37 ^b	0*
Intervalo interestro (dias)	195,0±8,0 ^a	194,0±5,0 ^a	169,0±7,0 ^b	197,0±9,0 ^a
Custo médio do tratamento (R\$) /animal	25,60	38,10	80,00	1,00

* Hiperplasia endometrial cística (achado ultrassonográfico).

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

G1 (10mg de B6/kg/dia), G2 (50mg de B6/kg/dia), G3 (5µg de cabergolina/kg/dia) e G4 (placebo).

Na avaliação ultrassonográfica, apenas uma cadela do G1 e uma cadela do G2 apresentaram prenhez positiva, contra oito cadelas do G3 ($P < 0,05$), demonstrando que o protocolo de tratamento com cabergolina $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ é viável para indução deaios férteis em cadelas no anestro intermediário (130-160 dias de anestro), com custo médio do tratamento de 80,00 reais por animal com peso médio de 9,2kg. Uma cadela do G4 apresentou inflamação uterina com acúmulo de exudato, sem secreção vaginal (piometra fechada). Esta cadela foi submetida a tratamento com aglepristone, prostaglandina e doxiciclina, uma vez que as bactérias isoladas com maior frequência em piometras abertas e fechadas apresentam 84,6% de sensibilidade a doxiciclina, sendo mais eficiente que outros fármacos antibióticos usados na rotina da clínica médica veterinária (Volpato *et al.*, 2014). Após o tratamento, a cadela retornou a atividade reprodutiva, com gestação confirmada no estro subsequente.

A Tab. 2 mostra que, entre os hormônios estudados, a PRL foi o único hormônio que sofreu alteração com a utilização de cloridrato de piridoxina ($50\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$) e cabergolina ($5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$) após 120h do início dos tratamentos, confirmando a ação inibitória desses fármacos na secreção de PRL em cadelas, sem interferência nas concentrações de FSH e LH. As diferentes respostas na indução do ciclo estral, portanto, podem ter sido influenciadas pelos distintos mecanismos de ação das moléculas de piridoxina e cabergolina, não dependendo exclusivamente da redução da PRL para interrupção do anestro.

O cloridrato de piridoxina foi capaz de interferir nas concentrações de PRL, pois atuou como coenzima em reações de descarboxilação, interferindo na síntese de dopamina, neurotransmissor inibidor de PRL. A dopamina é uma molécula que não ultrapassa a barreira hematoencefálica (BHE), sendo necessário que seu precursor, a L-DOPA, ultrapasse a BHE e sofra um processo de descarboxilação que requer o cofator fosfato de piridoxal, conhecido comercialmente como cloridrato de piridoxina, para que ocorra a conversão de L-DOPA em dopamina no hipotálamo (Bruice, 2006; Standaert e Galanter, 2009). Já a cabergolina, por sua vez, aumenta a neurotransmissão dopaminérgica por meio do estímulo direto de receptores D2, com resposta mais estável que o cloridrato de piridoxina, uma vez que os ADs não competem com aminoácidos para que ocorra o seu transporte através da BHE e não necessitam de conversão enzimática. Dessa forma, os ADs permanecem efetivos por mais tempo, quando

comparado a L-DOPA, sendo possível uma frequência de administração reduzida e resposta mais uniforme (Standaert e Galanter, 2009).

Tabela 2. Médias das concentrações séricas de PRL, LH e FSH dosadas em cadelas (130-160 dias de anestro) no dia zero (dia do início do tratamento, antes da primeira administração dos fármacos) e 120h após a administração de cloridrato de piridoxina ou cabergolina.

Tratamentos	Dosagem hormonal					
	PRL (ng/mL)		LH (mUI/mL)		FSH (mUI/mL)	
	Dia zero	120h	Dia zero	120h	Dia zero	120h
G1	1,50±0,11	1,38±0,20 ^A	0,22±0,12	0,21±0,13	≤0,05	≤0,05
G2	1,53±0,12 ^a	0,78±0,11 ^{bb}	0,18±0,11	0,19±0,11	≤0,05	≤0,05
G3	1,54±0,12 ^a	0,54±0,07 ^{bb}	0,20±0,11	0,19±0,13	≤0,05	≤0,05
G4	1,52±0,12	1,71±0,38 ^A	0,19±0,11	0,22±0,12	≤0,05	≤0,05

^{ab} Letras diferentes na mesma linha, comparando hormônios no dia zero e 120h de tratamento, indica diferença significativa (P<0,05).

^{AB} Letras diferentes na mesma coluna, comparando hormônios em 120h de tratamento, indica diferença significativa (P<0,05).

G1 (10mg de B6/kg/dia), G2 (50mg de B6/kg/dia), G3 (5µg de cabergolina/kg/dia) e G4 (placebo).

Nosso estudo confirmou os efeitos inibitórios da vitamina B6 na dose de 50mg/kg/dia sobre a PRL (P<0,05), após 120h do início do tratamento, sem eficácia na indução de estro, demonstrando que a supressão da PRL não é o único evento capaz de interromper o anestro em cadelas. É possível que a diferença no mecanismo de ação da cabergolina em relação à vitamina B6 possa ter contribuído para uma resposta mais estável, colaborando com o controle parácrino da foliculogênese. Nesse contexto, o hormônio anti-mülleriano, bem como IGF-1, hormônio do crescimento, insulina, FGF-2, FGF-7 e ativina, podem desempenhar um importante papel na transição de anestro para estro ao atuar diretamente no desenvolvimento folicular em cães, necessitando novos estudos para melhor compreensão desses controles parácrinos da reprodução (Nagashima *et al.*, 2016; Songsasen *et al.*, 2017).

As cadelas tratadas com cabergolina apresentaram intervalo interestro mais curto do que os demais grupos estudados, confirmando que este AD pode ser utilizado para antecipar o estro em cadelas no anestro intermediário (Vertegen *et al.*, 1999). A indução de estro pela supressão de PRL nesse estudo não foi influenciada pela ação luteotrófica da PRL, uma vez que, em todas as cadelas estudadas, os níveis de progesterona eram basais no início do tratamento. Também parece improvável que a cabergolina e a vitamina B6 afetem diretamente os neurônios de GnRH, visto que não foram observados efeitos sobre a concentração sérica de FSH e LH após 120h do início da administração dos

fármacos, sendo necessárias novas avaliações, em diferentes tempos, devido o padrão de secreção pulsátil desses hormônios em cadelas (Concannon, 1993).

Nenhuma cadela deste estudo manifestou efeitos colaterais adversos, durante os 20 dias de tratamento, com a administração de cloridrato de piridoxina ou cabergolina. Estes resultados demonstram que a vitamina B6 pode ser utilizada para reduzir os níveis de PRL em cadelas, de forma semelhante à cabergolina, quando administrada na dose de 50mg/kg/dia, sem sinais de toxicidade e sem influência sobre o ciclo estral. Outros estudos são necessários para investigar o efeito do cloridrato de piridoxina sobre a secreção láctea em cadelas.

CONCLUSÃO

O cloridrato de piridoxina nas concentrações estudadas não foi eficaz como a cabergolina para induzir o retorno da atividade cíclica e, portanto, não deve ser utilizado para protocolos de indução de estro em cadelas. Por sua vez, o tratamento com cloridrato de piridoxina 50mg/kg/dia foi capaz de atuar na supressão da prolactina em cadelas no anestro intermediário, assim como a cabergolina 5µg/kg/dia, demonstrando uma possível ação seletiva do cloridrato de piridoxina sobre a PRL, uma vez que as concentrações de FSH e LH mantiveram-se inalteradas quando avaliadas 120h após o início do tratamento. Estes resultados indicam que a vitamina B6 pode ser um potencial agente no tratamento de hiperprolactinemia em cadelas, necessitando de outros estudos para confirmar a sua ação sobre a interrupção da secreção láctea no pós-parto ou em estado de pseudogestação.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao laboratório de análises clínicas IDAN[®], à farmácia de manipulação Vida Animal[®], aos canis Stone Pet Center e Atlantic Valley, à equipe de médicos veterinários e auxiliares da Clínica Veterinária Pet do Bem[®] e ao CAPES/CNPq, que colaboraram na execução das diversas etapas da realização desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- AJITKUMAR, G.; PRASEEDA, R. Induction of fertile oestrus in dogs using cabergoline. *Vet Scan Online Vet J.*, v.5, n.1, p.56, 2010. Disponível em: <http://vetscan.co.in/v5n1/induction_of_fertile_oestrus_in_dogs_using_cabergoline.ht>. Acesso em: 26 abr. 2016.
- ANTONOV, A.; GEORGIEV, P. Induction of estrus in bitches with the dopamine agonist bromocriptine. *Int J Adv Res.*, v.3, n.11, p.962-965, 2015.
- BRUICE, P.Y. *Química orgânica*, vol.2. São Paulo: Person Prentice Hall, 2006. 46 p.
- CONCANNON, P.W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J Reprod Fertil Suppl.*, v.47, p.3-27, 1993.
- CONCANNON, P.W. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci.*, v.124, n.3, p.200-210, 2011.
- DELITALA, G.; MASALA, A.; ALAGNA, S.; DEVILLA, L. Effect of pyridoxine on human hypophyseal trophic hormone release: A possible stimulation of hypothalamic dopaminergic pathway. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.42, n.3, p.603-606, 1976.
- FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2004. 1089p.
- FOUKAS, M.D. An antilactogenic effect of pyridoxine. *J Obstet Gynaecol.*, v.80, n.8, p.718-720, 1973.
- GOBELLO, C. Aplicaciones clínicas de los agonistas dopaminérgicos en reproducción canina. *Analec Vet.*, v.20, n.2, p.31-38, 2000. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11121/documento_completo_.pdf?sequence=1>. Acesso em: 04 mai. 2016.
- HARRIS, A.R.C.; SMITH, M.S.; ALEX, S. et al. Pyridoxine (B6)-Induced inhibition of prolactin release in the female rat. *Endocrinology*, v.102, n.2, p 362-366, 1978.
- HOOVER, D.M.; CARLTON, W.W. The subacute neurotoxicity of excess pyridoxine HCl and clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline) in beagle dogs. I. Clinical disease. *Vet pathol.*, v.18, n.6, p.745-756, 1981.
- KOWALEWSKI, M. Regulation of corpus luteum function in the domestic dog (canis familiaris) and comparative aspects of luteal function in the domestic cat (Felis catus). *In: The Life Cycle of the Corpus Luteum*. Springer International Publishing, p.133-157, 2017.
- LEHMANN, E.L.; D'ABRERA, H.J.M. *Nonparametrics: statistical methods based on ranks*. 1 ed. New York: Springer, 2006. 463 p.
- MARCUS, R.G. Suppression of lactation with high doses of pyridoxine. *S A Med J.*, v.49, n.52, p.2155-2156, 1975.

- MCINTOSH, E.N. Treatment of women with the galactorrhea-amenorrhea syndrome with pyridoxine (vitamin B6). *J Clin Endocrinol Metab*, v. 42, n. 6, p. 1192-1195, 1976.
- MILONE, G. *Estatística: geral e aplicada*. Thomson Pioneira, 2004. 498p.
- MOGHEISEH, A.; NAZIFI, S.; AHMADI, M.R. et al. Comparing the Vitex-castus extract and cabergoline effects on estrous induction in female dogs. *Comparative Clinical Pathology*, p. 1-5, 2017.
- MULLER, E.E.; NISTICÒ, G. Neurotransmitter regulation of the anterior pituitary. *Brain Messengers and the Pituitary*. Academic Press, San Diego, p. 404, 1989.
- NAGASHIMA, J.B.; HANSEN, B.S.; SONGSASEN, N. et al. Anti-Müllerian Hormone in the Domestic Dog during the Anestrus to Oestrous Transition. *Reprod Domest Anim.*, v.51, n.1, p.158-164, 2016.
- NAK, D.; NAK, Y.; SIMSEK, G. Comparison of the use of cabergoline and gonadotrophin to treat primary and secondary anoestrus in bitches. *Aust Vet J.*, v.90, n.5, p.194-196, 2012.
- ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J.P. In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and-diestrus. *Domest Anim Endocrinol.*, v.14, n.1, p.25-38, 1997.
- PAPAVASILIOU, P.S.; COTZIAS, G.C.; DÜBY, S.E. et al. Levodopa in Parkinsonism: potentiation of central effects with a peripheral inhibitor. *N Engl J Med.*, v.286, n.1, p.8-14, 1972.
- PHILLIPS, W.E.; MILLS, J.H.; CHARBONNEAU, S.M. et al. Subacute toxicity of pyridoxine hydrochloride in the beagle dog. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v.44, n.2, p.323-333, 1978.
- RAINS, C.P.; BRYSON, H.M.; FITTON, A. Cabergoline: a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of hyperprolactinemia and inhibition of lactation. *Drugs*, v.49, n.2, p.255-279, 1995.
- SHINDE, S.; KRISHNAPPA, B.; KUMAR, B. et al. Induction of Fertile Estrus in Bitch (Pug) With Cabergolin—A Case Report. *Int J Vet Sci.*, v.3, n.1, p.1-3, 2014.
- SOKOLOWSKI, J.H.; STOVER, D.G.; VANRAVENSWAAY, F. Seasonal incidence of estrus and interestrus interval for bitches of seven breeds. *J Am Vet Med Assoc.*, v.171, n.3, p.271-273, 1977.
- SONGSASEN, N.; NAGASHIMA, J.; THONGKITTIDILOK, C. Endocrine and paracrine controls of canine follicular development and function. *Reprod Domest Anim.*, v.52, n.S2, p.29-34, 2017.
- STANDAERT, D.; GALANTER, J.M. Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. *Princípios de farmacologia: a base fisiopatologia da farmacoterapia*, p. 166-185, 2009. Disponível em: <<http://leg.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Farmacologia%20da%20neurotransmissao%20dopaminergica.pdf>>. Acessado em 10 de jun. 2017.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; SILVA, L.D.; CONCANNON, P.W. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology*, v.51, n.3, p.597-611, 1999.

VOLPATO, R.; ARAUJO, M.S.; TSUNEMI, M.H. *et al.* Caracterização microbiológica e perfil de resistência das bactérias isoladas do útero de cadelas com piometra aberta e fechada. *Rev Port Cien Vet.*, p.100-104, 2004. Disponível em: <http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf12_2014/100-104.pdf>. Acessado em: 17 fev 2017.

5. ARTIGO CIENTÍFICO II

USO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA NA INTERRUÇÃO DA LACTAÇÃO EM CADELAS COM PSEUDOGESTAÇÃO

Uso do cloridrato de piridoxina na interrupção da lactação em cadelas com pseudogestação

[Use of pyridoxine chloridrate in the interruption of lactation in female dogs with pseudopregnancy]

M.C. Silva^{1*}, F.L. Silva¹, P.E.B. Guedes¹, P.P.N. Snoeck¹

¹Programa de Pós-Graduação Ciência Animal (PPGCA), Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, Brasil.

* E-mail: maira_corona@hotmail.com

RESUMO

O cloridrato de piridoxina é uma coenzima capaz de catalisar reações de descarboxilação, favorecendo a síntese de dopamina, neurotransmissor inibidor de prolactina. Dessa forma, buscou-se avaliar a utilização do cloridrato de piridoxina no tratamento da hiperplasia mamária e lactação, em cadelas com pseudogestação, bem como a ocorrência de efeitos colaterais associados ao tratamento. Foram selecionadas 40 cadelas, sem raça definida, em diestro não gestacional, com queixa clínica de secreção láctea. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, tratados por via oral com 10mg/kg/dia (G1) e 50mg/kg/dia (G2) de cloridrato de piridoxina, 5µg/kg/dia (G3) de cabergolina e grupo controle/placebo (G4), por 20 dias. Foram investigados os efeitos dos tratamentos sobre a secreção láctea e a manifestação de efeitos colaterais indesejados, as alterações macroscópicas uterinas e ovarianas e a histologia uterina. O G2 e o G3 foram igualmente eficientes ($P > 0,05$) na supressão da lactação, diferenciando-se ($P < 0,05$) dos demais grupos estudados em todas as semanas investigadas. Não foram verificados efeitos colaterais sistêmicos ou alterações uterinas associadas à administração dos fármacos estudados. A vitamina B6 demonstrou ser uma alternativa segura e economicamente viável para interrupção da lactação em cadelas com pseudociese.

Palavras-chave: cabergolina, espécie canina, pseudociese, vitamina B6

ABSTRACT

Pyridoxine chloridrate is a coenzyme capable of catalyzing decarboxylation reactions, which interferes with the synthesis of dopamine, a prolactin inhibitory neurotransmitter. Thus, we sought to evaluate the use of pyridoxine chloridrate in the treatment of breast hyperplasia and lactation in female dogs with pseudopregnancy, as well as the occurrence of side effects associated with it. A total of 40 female dogs, with no defined breed, in non-gestational diestrous, with clinical complaint of milk secretion were selected. The female dogs were divided into four experimental groups with 10 animals each, treated orally with 10mg/kg/day (G1) and 50mg/kg day (G2) of pyridoxine chloridrate, 5µg/kg/day (G3) of cabergoline and group Control/Placebo (G4) for 20 days. The effects of treatments were investigated on milk secretion and systemic side effects, macroscopic uterine and ovarian alterations and uterine histology. G2 and G3 were equally efficient ($P>0.05$) in lactation suppression, differing ($P>0.05$) from the other groups during the investigated weeks. There was no systemic side effects or uterine changes associated with administration of the studied drugs. Vitamin B6 has been shown to be a safe and economically viable alternative for interruption of lactation in female dogs with pseudopregnancy.

Keywords: cabergoline, canine species, pseudociese, vitamin B6

INTRODUÇÃO

A pseudociese ou pseudogestação é uma síndrome que acomete cadelas no diestro não gestacional, caracterizada por alterações fisiológicas semelhantes ao final da gestação ou pós-parto. Os sinais clínicos são extremamente variáveis, mas geralmente as cadelas apresentam desenvolvimento mamário com secreção láctea e alterações comportamentais como inquietação, anorexia e comportamento materno (Feldman e Nelson, 2004; Gobello *et al.*, 2001a,b). As cadelas susceptíveis frequentemente apresentam recidiva emaios sucessivos (Feldman e Nelson, 2004), desenvolvendo a síndrome após a exposição à progesterona e subsequente redução desse hormônio (Gobello *et al.*, 2001a,b,c).

A prolactina (PRL) desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da pseudogestação em associação à redução abrupta e anormal da progesterona (P4) na

fase lútea tardia (Concannon, 1989; Gobello *et al.*, 2001a,b,c). Estudos demonstraram falta de consistência entre os níveis de concentração séricas da PRL e a intensidade de sinais clínicos da pseudociese (Hoffmann *et al.*, 1992; Harvey *et al.*, 1997; Harvey *et al.*, 1999). No entanto, a utilização de derivados de ergot na terapia da pseudociese evidencia a importância da PRL na etiopatogenia dessa síndrome (Gobello *et al.*, 2001c).

A metergolina é o único medicamento comercializado no Brasil para tratamento da pseudociese canina. Possui meia-vida curta e intensos efeitos colaterais, como manifestações gastrointestinais, agressividade, vocalização e hiperexcitação (Hamon *et al.*, 1981; Fieni *et al.*, 1999). O cloridrato de piridoxina demonstrou ser uma alternativa viável na supressão da lactação em mulheres e na redução dos níveis de PRL (Foukas, 1973; Delitala *et al.*, 1976). Ratas tratadas com vitamina B6 também apresentaram diminuição nas concentrações de PRL, sugerindo um efeito dopaminérgico da piridoxina sobre o hipotálamo (Harris *et al.*, 1978).

O efeito do cloridrato de piridoxina sobre a lactação de cadelas com pseudogestação ainda não foi investigado. Estudo realizado com cães da raça bulldog francês verificou que a vitamina B6 (50mg/kg) pode interferir na concentração sérica de PRL de forma semelhante à cabergolina (5µg/kg) (Comunicação pessoal - Corona, 02 de agosto 2017/UDESC), uma vez que atua como coenzima em processos de descarboxilação da L-dopa em dopamina, principal fator inibidor de PRL (Bruce, 2006). Desta forma, é possível que a vitamina B6 também interfira nos sinais clínicos da pseudogestação, assim como os fármacos derivados de ergot (Gobello *et al.*, 2001c).

A recomendação de vitaminas B6 para cães na dieta é de 1,5mg/kg de matéria seca, independente da fase de desenvolvimento (NRC, 2006). As rações comerciais apresentam nível de garantia de vitamina B6 de 6mg/kg de alimento (Golden/Premier® e N&D/Farmina®), superando as exigências nutricionais para a espécie canina.

O consumo excessivo de vitamina B6 (150mg/kg/dias) por um período muito longo (mais de 100 dias) pode induzir quadros de neurotoxicidade subaguda, com alteração na propriocepção em membros anteriores e posteriores (Hoover e Carlton, 1981). Dose intermediária (50mg/kg/dia) por até 107 dias, mostrou-se segura e sem efeitos colaterais indesejáveis (Phillips *et al.*, 1978). Desta forma, buscou-se avaliar o efeito do cloridrato de piridoxina no desenvolvimento mamário e secreção láctea bem como a ocorrência de

efeitos colaterais sistêmicos da administração deste fármaco e possíveis alterações macroscópicas uterinas e ovarianas e microscópicas uterinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 40 cadelas sem raça definida, de abrigos ou proprietários particulares, entre dois e seis anos de idade, com peso variando entre cinco e 15 quilos, apresentando hiperplasia mamária e secreção láctea associada à pseudogestação, em estágio de diestro confirmado por citologia vaginal. As cadelas foram alocadas em diferentes grupos experimentais, cada um com 10 animais. O grupo 1 (G1) recebeu cloridrato de piridoxina 10mg/kg/dia, o grupo 2 (G2) cloridrato de piridoxina 50mg/kg/dia, o grupo 3 (G3-controle positivo) cabergolina 5µg/kg/dia e o grupo controle (G4-controle negativo) placebo (cápsulas vazias). Os fármacos foram administrados diariamente, por via oral, em forma de cápsulas manipuladas (Vida Animal®) por 20 dias.

Os animais permaneceram em suas residências durante o período de tratamento e foram acompanhados pelos proprietários que administraram os fármacos. Semanalmente eram avaliados, na Clínica Veterinária Pet do Bem®, quanto à produção de leite por meio de ordenha e registro de possíveis queixas e efeitos colaterais indesejados.

Foram realizadas dosagens de PRL no dia zero (duas horas antes da administração do primeiro fármacos) e 120 h após o início do tratamento, a fim de verificar uma possível correlação entre as concentrações séricas de PRL e a intensidade de sinais clínicos da pseudociese. Para isso, amostras de sangue (5mL) foram obtidas por punção venosa jugular em tubos de coleta à vácuo com ativador de coágulo, centrifugadas a 3000 rpm durante 7 minutos para obtenção de soro, alíquotadas em tubos de microcentrífuga (500 µL) e armazenadas a -20° C até a análise realizada pelo laboratório IDAN®.

Ao final do período experimental (20 dias de tratamento), os animais foram submetidos a ovariário-salpingo-histerectomia (OSH). O aparelho reprodutor foi analisado macroscopicamente a fim de identificar a presença de estruturas foliculares e/ou luteínicas nos ovários e as possíveis alterações patológicas como cistos, inflamação local e presença de conteúdo no lúmen uterino. Após essa avaliação foram coletados fragmentos uterinos de 2cm² por meio de secção transversal do terço médio de ambos os

cornos, os quais foram conservados em formol a 10% até o processamento. Os achados histológicos foram caracterizados segundo metodologia de De Bosschere *et al.* (2001).

As variáveis foram comparadas por meio de média, desvio padrão e via teste de hipótese. Para comparação dentro de um mesmo grupo foi aplicado o teste de Wilcoxon para dados pareados. Para comparações entre os grupos antes e depois de cada tratamento, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (Milone, 2004; Lehmann e D'Abrera, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cadelas tratadas com cloridrato de piridoxina na dose de 50mg/kg (G2) e cabergolina 5µg/kg (G3) apresentaram supressão da lactação na primeira semana em 40% (n=4) e 60% (n=6) dos animais investigados, respectivamente. Na segunda semana, as cadelas tratadas com cloridrato de piridoxina na dose de 10mg/kg (G1) e 50mg/kg (G2) e cabergolina 5µg/kg (G3) apresentaram interrupção da lactação em 20% (n=2), 90% (n=9) e 100% (n=10) dos animais tratados, respectivamente. Ao final da terceira semana, 50% dos animais do G1 (n=5), 100% do G2 (n=10), 100% do G3 (n=10) e 20% do G4 (n=2) não apresentavam produção de leite e hiperplasia mamária (Tab. 1).

O cloridrato de piridoxina (50mg/kg) e cabergolina (5µg/kg) foram igualmente eficientes ($P>0,05$) na supressão da lactação à ordenha e na remissão visual do desenvolvimento mamário das cadelas tratadas, diferenciando-se ($P<0,05$) das fêmeas dos demais grupos em todas as semanas investigadas, evidenciando a importância da PRL no desenvolvimento e manutenção da pseudociese (Okkens *et al.*, 1997). A melhora dos sinais clínicos nas cadelas dos demais grupos pode estar associada à conhecida tendência de remissão gradual da pseudogestação (Gobello *et al.*, 2001a,b). Não foram verificados efeitos colaterais indesejados relacionados à administração dos fármacos, como náusea, vômito, hiperexcitação e diarreia. O tratamento com a vitamina B6 apresentou menor custo, sendo uma alternativa eficiente e acessível para o tratamento da lactação em pseudogestação (Tab 1).

Tabela 1– Número e percentual semanal (acumulado) de animais que manifestaram supressão da lactação com a utilização de piridoxina (10mg/kg/dia ou 50mg/kg/dia) ou de cabergolina (5µg/kg/dia) em cadelas com pseudociese.

Grupo	1ª semana	2ª semana	3ª semana	Custo médio do tratamento (R\$)
G1 (n=10)	0 ^B (0%)	2 ^B (20%)	5 ^B (50%)	25,00
G2 (n=10)	4 ^A (40%)	9 ^A (90%)	10 ^A (100%)	38,00
G3 (n=10)	6 ^A (60%)	10 ^A (100%)	10 ^A (100%)	80,00
G4 (n=10)	0 ^B (0%)	0 ^B (0%)	2 ^B (20%)	1,00

^{A,B} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P<0,05$).
G1 (10mg de B6/kg/dia), G2 (50mg de B6/kg/dia), G3 (5µg de cabergolina /kg/dia) e G4 (placebo).

As concentrações séricas de PRL de cadelas com pseudogestação sofreram reduções com a administração de cloridrato de piridoxina 50mg/kg (G2) e cabergolina 5µg/kg (G3), sendo igualmente eficientes ($P>0,05$) e diferenciando-se ($P<0,05$) dos demais grupos estudados (Tab 2). Esses resultados confirmam a ação inibitória da vitamina B6 sobre a concentração sérica de PRL em cadelas.

Tabela 2. Médias das concentrações séricas de PRL em cadelas com pseudociese nos tempos 0h e 120h após a administração de cabergolina ou cloridrato de piridoxina.

Tratamento	PRL (ng/mL)	
	Dia zero	120h
G1	2,9 ^A	3,0 ^A
G2	1,2 ^{aB}	<0,6 ^{bB}
G3	3,6 ^{aA}	<0,6 ^{bB}
G4	3,1 ^A	3,3 ^A

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indica diferença significativa ($P<0,05$).
^{AB} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P<0,05$).
G1 (10mg de B6/kg/dia), G2 (50mg de B6/kg/dia), G3 (5µg de cabergolina /kg/dia) e G4 (placebo).

As cadelas do G2 apresentaram concentração sérica de PRL inferior aos demais grupos ($P<0,05$) antes do início do tratamento (Tab. 2), mas na avaliação clínica esses animais não se distinguiam dos outros grupos quanto aos sinais da pseudociese. É possível que as manifestações clínicas não estejam associadas somente à concentração de PRL, mas também à bioatividade da molécula e sua afinidade por receptores, uma vez que a espécie canina possui diferentes formas moleculares da PRL com concentrações séricas

semelhantes, denominadas como grandes (>67kDa), nativas (23kDa) e fragmentadas (<20kDa) (Gobello *et al.*, 2001d). Em humanos, a forma monomérica da PRL (23kDa) apresenta maior concentração sérica (80-90%) em indivíduos normais, com alta afinidade a receptores e elevada bioatividade. Já as macropolactinas (48-56kDa) e as PRL glicosiladas (25kDa) são menos imunorreativas e apresentam menor atividade biológica (Sinha, 1995; Hattori e Inagaki, 1997; Vieira, 2002). É possível que a heterogeneidade da molécula de PRL na espécie canina também influencie nos achados clínicos como ocorre em humanos. No entanto, a bioatividade de cada molécula em cães ainda é desconhecida. (Gobello *et al.*, 2001d).

Oito cadelas do G1 (8/10) e nove cadelas do G4 (9/10) possuíam corpo lúteo (CL) identificável macroscopicamente em pelo menos um dos ovários, no momento da OSH, demonstrando a importância da PRL na manutenção do CL. O efeito luteotrófico da PRL em cães garante a manutenção dos níveis de progesterona independente das cadelas estarem ou não gestantes (Onclin e Verstegen, 1997; Kowalewski *et al.*, 2011; Kowalewski *et al.*, 2014) e é essencial para a preparação e manutenção da lactação (Rufo *et al.*, 2016). Desta forma, é possível que a redução dos níveis de PRL em cadelas com a utilização de piridoxina (50mg/kg/dia) ou cabergolina (5µg/kg/dia) tenha estimulado a regressão luteal prematura. Sendo assim, outros estudos devem ser realizados a fim de verificar a ação do cloridrato de piridoxina sobre a secreção de progesterona e indução de aborto. Uma cadela do G4 (controle) apresentou múltiplos cistos ovarianos e lúmen uterino com grande volume de conteúdo purulento. Os demais animais não apresentaram alterações macroscópicas.

A avaliação histológica dos fragmentos uterinos não revelou alterações graves que pudessem comprometer a fisiologia uterina. Foi verificado um padrão morfológico similar entre os grupos ($P>0,05$), com áreas de hemorragia endometrial moderada em camadas mais superficiais, hiperemia endometrial moderada e edema endometrial discreto, sem áreas de distensão glandular e ausência de infiltrados mononucleares. Todavia, essas manifestações podem estar associadas à influência estrogênica do ciclo estral. Apenas um indivíduo do G4 apresentou complexo hiperplasia endometrial cística piometra (De Bosschere *et al.*, 2001) com dilatação cística de glândulas endometriais de aspecto difuso e acentuado, presença de infiltrado inflamatório (macrófagos, neutrófilos e plasmócitos) e miometrite multifocal moderada, patologia considerada pré-existente e

associada à presença de múltiplos cistos ovarianos identificados na avaliação macroscópica.

CONCLUSÃO

A vitamina B6 (50mg/kg) demonstrou ser uma alternativa segura e economicamente viável para a redução das concentrações séricas de PRL, a remissão do desenvolvimento mamário e a interrupção da lactação em cadelas pseudogestantes, apresentando resultados satisfatórios com 14 dias de tratamento.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Clínica Veterinária Pet do Bem[®] e aos laboratório Cremasco[®] e IDAN[®], que possibilitaram a realização desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- BRUICE, P.Y. *Química orgânica*, vol.2. São Paulo: Person Prentice Hall, 2006. 46 p.
- CONCANNON, P.W. Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnancy and pregnancy in dogs. *J Small Anim Pract.*, v.10, p.1269-1282, 1989.
- DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H. et al. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected?. *Theriogenology*, v. 55, n. 7, p. 1509-1519, 2001.
- DELITALA, G.; MASALA, A.; ALAGNA, S.; DEVILLA, L. Effect of pyridoxine on human hypophyseal trophic hormone release: A possible stimulation of hypothalamic dopaminergic pathway. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.42, n.3, p.603-606, 1976.
- FELDMAN, E.C.; NELSON, R. W. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. 1089 p.
- FOUKAS, M.D. An antilactogenic effect of pyridoxine. *J Obstet Gynaecol.*, v.80, n.8, p.718-720, 1973.
- GOBELLO, C.; CONCANNON, P.W.; VERSTEGEN, J.P. Canine pseudopregnancy: a review. In: *International Veterinary Information Service*, 2001a. Disponível em: <<http://files.shroomery.org/attachments/8706432-ivis.pdf>>. Acessado em 04 mai. 2016.
- GOBELLO, C.; DE LA SOTA, R.L.; GOYA, R.G. A review of canine pseudocyesis. *Reprod Dom Anim.*, v.36, n.6, p.283-288, 2001b.
- GOBELLO, C.; DE LA SOTA, R.L.; GOYA, R.G. Study of the change of prolactin and progesterone during dopaminergic agonist treatments in pseudopregnant bitches. *Anim Reprod Sci.*, v. 66, n. 3, p. 257-267, 2001c.
- GOBELLO, C.; COLOMBANI, M., SCAGLIA, H. et al. Heterogeneity of circulating prolactin in the bitch. *Reprod Nutr Dev.*, v.41, n.6, p.505-511, 2001d.
- HAMON, M.; MALLAT, M.; HERBET, A. et al. Metergoline: A new ligand of serotonin receptors in the rat brain. *J Neurochem.*, v.36, n.2, p.613-626, 1981.
- HARRIS, A.R.C.; SMITH, M.S.; ALEX, S. et al. Pyridoxine (B6)-Induced inhibition of prolactin release in the female rat. *Endocrinology*, v.102, n.2, p 362-366, 1978.
- HARVEY, M.J.; DALE, M.J.; LINDLEY, S.; WATERSTON, M.M. A study of the aetiology of pseudopregnancy in the bitch and the effect of cabergoline therapy. *Vet Rec.*, v.144, n.16, p.433-436, 1999.
- HARVEY, M.J.A.; CAUVIN, A.; DALE, M. et al. Effect and mechanisms of the anti-prolactin drug cabergoline on pseudopregnancy in the bitch. *J Small Anim Pract.*, v.38, n.8, p.336-339, 1997.
- HATTORI, N.; INAGAKI, C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: bioassay and clearance studies of PRL-immunoglobulin G complex. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.82, n.9, p.3107-3110, 1997.
- HOFFMANN, B.; HÖVELER, R.; HASAN, S.H.; FAILING, K. Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. *J Reprod Fertil.*, v.96, n.2, p.837-845, 1992.

HOOVER, D.M.; CARLTON, W.W. The subacute neurotoxicity of excess pyridoxine HCl and clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline) in beagle dogs. I. Clinical disease. *Vet pathol.*, v.18, n.6, p.745-756, 1981.

KOWALEWSKI, M.P. Luteal regression vs. prepartum luteolysis: Regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. *Reprod Biol.*, v. 14, n.2, p.89-102, 2014.

KOWALEWSKI, M.P.; MICHEL, E.; GRAM, A. et al. Luteal and placental function in the bitch: Spatio-temporal changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition. *Reprod Biol Endocrinol.*, v.9, n.1, p.109, 2011.

LEHMANN, E.L.; D'ABRERA, H.J.M. *Nonparametrics: statistical methods based on ranks*. 1 ed. New York: Springer, 2006. 463 p.

MILONE, G. *Estatística: geral e aplicada*. Thomson Pioneira, 2004. 498p.

NACIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. *Nutrient Requirements of Dogs and Cats*. National Academy Press. Washington, 2006, 424p.

OKKENS, A.C.; DIELEMAN, S.J.; KOOISTRA, H.S.; BEVERS, M.M. Plasma concentrations of prolactin in overtly pseudopregnant Afghan hounds and the effect of metergoline. *J Reprod Fertil Suppl.*, v.51, p.295-301, 1997.

ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J.P. In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and-diestrus. *Domest Anim Endocrinol.*, v.14, n.1, p.25-38, 1997.

PHILLIPS, W.E.; MILLS, J.H.; CHARBONNEAU, S.M. et al. Subacute toxicity of pyridoxine hydrochloride in the beagle dog. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v.44, n.2, p.323-333, 1978.

RUFO, J.G.; GAZZANO, A.; MARITIC, C. Prolactin in female domestic dogs: a mini-review. *M J Veter.*, v.1, n.1, 2016. Disponível em: <http://www.mathewsopenaccess.com/PDF/Veterinary/M_J_Vetr_1_1_006.pdf>. Acessado em: 07 de jan. 2017.

SINHA, Y.N. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev.*, v. 16, n. 3, p. 354-369, 1995.

VIEIRA, J.G.H. Macroprolactinemia. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, v.46, n.1, p.45-50, 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cloridrato de piridoxina (vitamina B6) foi ineficaz na indução de estro em cadelas no anestro, mas demonstrou ser uma alternativa de baixo custo para tratamento da hiperprolactinemia, hiperplasia mamária e lactação em cadelas com pseudogestação. A metergolina é o único medicamento comercializado no Brasil para tratamento de cães com pseudociese. No entanto, essa medicação apresenta efeitos colaterais indesejáveis como manifestações gastrointestinais, agressividade, hiperexcitação e vocalização. Já a vitamina B6 demonstrou ser eficiente na supressão da lactação e remissão do desenvolvimento mamário, sem manifestações clínicas indesejáveis.

REFERÊNCIAS

- AJITKUMAR, G.; PRASEEDA, R. Induction of fertile oestrus in dogs using cabergoline. **Feedback**, v. 5, n. 1, p. 56, 2010. Disponível em:<http://vetscan.co.in/v5n1/induction_of_fertile_oestrus_in_dogs_using_cabergoline.ht>. Acesso em: 26 abr. 2016.
- AJITKUMAR, G.; SREEKUMARAN, T.; PRASEEDA, R. et al. Comparative efficacy of bromocriptine, cabergoline and thyroxine in inducing oestrus in bitches. **Veterinary Research Communications**, v. 34, n. 1, p. 65-69, 2010.
- ALLEN, W.E. Pseudopregnancy in the bitch: the current view on aetiology and treatment. **Journal of Small Animal Practice**, v. 27, n. 7, p. 419-424, 1986.
- ANTONOV, A.; GEORGIEV, P. Induction of estrus in bitches with the dopamine agonist bromocriptine. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 11, p. 962-965, 2015.
- ASA, S.L.; KELLY, M.A.; GRANDY, D.K.; LOW, M.J. Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice. **Endocrinology**, v. 140, n. 11, p. 5348-5355, 1999.
- BEN-JONATHAN, N. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. **Endocrine Reviews**, v. 6, n. 4, p. 564-589, 1985.
- BLAKE, C.A. Effects of intravenous infusion of catecholamines on Rat Plasma luteinizing hormone and prolactin concentrations. **Endocrinology**, v. 98, n. 1, p. 99-104, 1976.
- BRUCE, P.Y. **Química Orgânica**, vol.2. São Paulo: Person Prentice Hall, 2006. 46 p.
- CIRIT, Ü.; BACINOGLU, S.; CANGUL, I.T. et al. The effects of a low dose of cabergoline on induction of estrus and pregnancy rates in anestrus bitches. **Animal Reproduction Science**, v. 101, n. 1, p. 134-144, 2007.
- CONCANNON, P.W.; MCCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 39, p. 3-25, 1989.
- CONCANNON, P.; HANSEL, W.; MCENTEE, K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. **Biology of Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 604-613, 1977.
- CONCANNON, P.W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 47, p. 3-27, 1993.
- CONCANNON, P.W. Estrus induction in dogs: approaches, protocols and applications. In: **World Congress of the World Small Animal Veterinary Association**, 2005. Disponível em:

<<http://www.lowchensaustralia.com/breeding/induction.htm>>. Acessado em 20 jan. 2015.

CONCANNON, P.W. Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnancy and pregnancy in dogs. **Small Animal Practice**, v. 10, p. 1269-1282, 1989a.

CONCANNON, P.W. Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 39, p. 149-160, 1989b.

CONCANNON, P.W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3, p. 200-210, 2011.

CONCANNON, P.W.; CASTRACANE, V.D.; TEMPLE, M.; MONTANEZ, A. Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. **Animal Reproduction Science**, v. 6, n. 1, p. 172-193, 2009.

CONCANNON, P.W.; HANSEL, W.; VISEK, W.J. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 13, n. 1, p. 112-121, 1975.

CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. **Fisiologia Veterinaria**. McGraw-Hill Interamericana, 1999.

DAY, R.N.; LIU, J.; SUNDMARK, V. et al. Selective inhibition of prolactin gene transcription by the ETS-2 repressor factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 48, p. 31909-31915, 1998.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H. et al. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected?. **Theriogenology**, v. 55, n. 7, p. 1509-1519, 2001.

DE COSTER, R.; BECKERS, J.F.; BEERENS, D.; DE MEY, J. A homologous radioimmunoassay for canine prolactin: plasma levels during the reproductive cycle. **Acta Endocrinologica**, v. 103, n. 4, p. 473-478, 1983.

DELITALA, G.; MASALA, A.; ALAGNA, S.; DEVILLA, L. Effect of pyridoxine on human hypophyseal trophic hormone release: A possible stimulation of hypothalamic dopaminergic pathway. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 42, n. 3, p. 603-606, 1976.

ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole, v.4, 1992.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 375-387, 2000.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2004. 1089p.

FIENI, F.; VERSTEGEN, J.; HERAUD, V.; ONCLIN, K. Physiology of prolactin, the pharmacology of prolactin inhibiting drugs and applications for

bitches. **Pratique Medicale et Chirurgicale de Animal de Compagnie**, v. 34, n. 3, p. 187-198, 1999.

FOUKAS, M.D. An antilactogenic effect of pyridoxine. **International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 80, n. 8, p. 718-720, 1973.

GOBELLO, C. Aplicaciones clínicas de los agonistas dopaminérgicos en reproducción canina. **Analecta Veterinaria**, v. 20, 2000. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11121/documento_completo_...pdf?sequence=1>. Acesso em: 04 mai. 2016.

GOBELLO, C. New GnRH analogs in canine reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 100, n. 1, p. 1-13, 2006.

GOBELLO, C.; COLOMBANI, M.; SCAGLIA, H. et al. Heterogeneity of circulating prolactin in the bitch. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, n. 6, p. 505-511, 2001d.

GOBELLO, C.; CONCANNON, P.W.; VERSTEGEN, J.P. Canine pseudopregnancy: a review. In: Concannon, P.W.; England, G.; Verstegen, J.; Linde-Forsberg, C. (Ed.) Recent advances in small animal reproduction. Ithaca: **International Veterinary Information Service**, 2001a.

GOBELLO, C.; CORRADA, Y. Biotechnology in canine reproduction: an update. **Analecta Veterinaria**, v. 23, p. 30-37, 2003.

GOBELLO, C.; DE LA SOTA, R.L.; GOYA, R.G. A review of canine pseudocyesis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 6, p. 283-288, 2001b.

GOBELLO, C.; DE LA SOTA, R.L.; GOYA, R.G. Study of the change of prolactin and progesterone during dopaminergic agonist treatments in pseudopregnant bitches. **Animal Reproduction Science**, v. 66, n. 3, p. 257-267, 2001c.

GRÜNAU, B.; NOLTE, I.; HOPPEN, H.O. The treatment of pseudopregnancy in the bitch with prolactin inhibitors metergoline and bromocriptine. **Tierärztliche Praxis**, v. 24, n. 2, p. 149-155, 1996.

HAMON, M.; MALLAT, M.; HERBET, A. et al. [3H] Metergoline: a new ligand of serotonin receptors in the rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 36, n. 2, p. 613-626, 1981.

HARRIS, A.R.C.; SMITH, M.S.; ALEX, S. et al. Pyridoxine (B6)-induced inhibition of prolactin release in the female rat. **Endocrinology**, v. 102, n. 2, p. 362-366, 1978.

HARVEY, M.J.; DALE, M.J.; LINDLEY, S.; WATERSTON, M. M. A study of the aetiology of pseudopregnancy in the bitch and the effect of cabergoline therapy. **The Veterinary Record**, v. 144, n. 16, p. 433-436, 1999.

HARVEY, M.J.A.; CAUVIN, A.; DALE, M. et al. Effect and mechanisms of the anti-prolactin drug cabergoline on pseudopregnancy in the bitch. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, n. 8, p. 336-339, 1997.

HATTORI, N.; INAGAKI, C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: bioassay and clearance studies of PRL-immunoglobulin G complex. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 9, p. 3107-3110, 1997.

HOFFMANN, B.; BÜSGES, F.; ENGEL, E. et al. Regulation of corpus luteum function in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 4, p. 232-240, 2004.

HOFFMANN, B.; HÖVELER, R.; HASAN, S.H.; FAILING, K. Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, n. 2, p. 837-845, 1992.

HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 275-288, 1996.

HOLST, P.A.; PHEMISTER, R.D. The prenatal development of the dog: preimplantation events. **Biology of Reproduction**, v. 5, n. 2, p. 194-206, 1971.

HOOVER, D.M.; CARLTON, W.W. The subacute neurotoxicity of excess pyridoxine HCl and clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline) in beagle dogs. I. Clinical disease. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 6, p. 745-756, 1981.

IBGE. **Pesquisa nacional por amostra em domicílio**, 2013. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acessado em 28 de jun. 2017.

JANSSENS, L.A. Treatment of pseudopregnancy with bromocriptin, an ergot alkaloid. **The Veterinary Record**, v. 119, n. 8, p. 172-174, 1986.

JEFFCOATE, I.A. Endocrinology of anoestrous bitches. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 47, p. 69-76, 1993.

JÖCHLE, W.; ARBEITER, K.; POST, K. et al. Effects on pseudopregnancy, pregnancy and interoestrous intervals of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 39, p. 199-207, 1988.

JÖCHLE, W.; BALLABIO, R.; DI SALLE, E. Inhibition of lactation in the beagle bitch with the prolactin inhibitor cabergoline (FCE 21336): dose response and aspects of long-term safety. **Theriogenology**, v. 27, n. 5, p. 799-810, 1987.

JOHNSTON, S.D. Pseudopregnancy in the bitch. **Current Veterinary Theriogenology**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, p. 490-491, 1986.

KOWALEWSKI, M. Regulation of corpus luteum function in the domestic dog (*canis familiaris*) and comparative aspects of luteal function in the domestic cat (*Felis catus*). In: **The Life Cycle of the Corpus Luteum**. Springer International Publishing, p.133-157, 2017.

KOWALEWSKI, M.P. Luteal regression vs. prepartum luteolysis: Regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. **Reproductive Biology**, v. 14, n. 2, p. 89-102, 2014.

KOWALEWSKI, M.P.; MICHEL, E.; GRAM, A. et al. Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 109, 2011.

KUTZLER, M.A. Induction and synchronization of estrus in dogs. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 766-775, 2005.

LEHMANN, E.L.; D'ABRERA, H.J.M. **Nonparametrics: statistical methods based on ranks**. New York: Springer, 2006 463 p.

LINDSAY, F.E.F.; JEFFCOATE, I.A. Clinical methods of estimating the optimum period for natural and artificial-insemination in the bitch. **Journal of Reproduction And Fertility**, p. 556-557, 1993.

MACLEOD, R.M.; LEHMEYER, J.E. Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. **Endocrinology**, v. 94, n. 4, p. 1077-1085, 1974.

MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R.. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. **Journal of Experimental Zoology**, v. 196, n. 2, p. 189-195, 1976.

MARCUS, R.G. Suppression of lactation with high doses of pyridoxine. **South African Medical Journal**, v. 49, n. 52, p. 2155-2156, 1975.

MCINTOSH, E.N. Treatment of women with the galactorrhea-amenorrhea syndrome with pyridoxine (vitamin B6). **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 42, n. 6, p. 1192-1195, 1976.

MILONE, G. **Estatística: geral e aplicada**. Pioneira Thomson Learning, 2004.

NACIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. National Academy Press. Washington, 2006, 424p.

MOGHEISEH, A.; NAZIFI, S.; AHMADI, M.R. Comparing the vitex-castus extract and cabergoline effects on estrous induction in female dogs. **Comparative Clinical Pathology**, p. 1-5, 2017.

MULLER, E.E.; NISTICÒ, G. Neurotransmitter regulation of the anterior pituitary. **Brain Messengers and the Pituitary**. Academic Press, San Diego, p. 404, 1989.

MURRELL, T.G.C. Epidemiological and biochemical support for a theory on the cause and prevention of breast cancer. **Medical Hypotheses**, v. 36, n. 4, p. 389-396, 1991.

NAGASHIMA, J.B.; HANSEN, B.S., SONGSASEN, N. et al. Anti-müllerian hormone in the domestic dog during the anestrus to oestrous transition. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 1, p. 158-164, 2016.

NAK, D.; NAK, Y.; SIMSEK, G. Comparison of the use of cabergoline and gonadotrophin to treat primary and secondary anoestrus in bitches. **Australian Veterinary Journal**, v. 90, n. 5, p. 194-196, 2012.

OKKENS, A.C.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; WILLEMSE, A. Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. **Veterinary Quarterly**, v. 12, n. 4, p. 193-201, 1990.

OKKENS, A.C.; DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M.M.; WILLEMSE, A.H. Evidence for the non-involvement of the uterus in the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. **Veterinary Quarterly**, v. 7, n. 3, p. 169-173, 1985.

OKKENS, A.C.; DIELEMAN, S.J.; KOOISTRA, H.S.; BEVERS, M.M. Plasma concentrations of prolactin in overtly pseudopregnant Afghan hounds and the effect of metergoline. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 51, p. 295-301, 1997.

ONCLIN, K.; SILVA, L.D.; DONNAY, I.; VERSTEGEN, J.P. Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist, cabergoline. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 47, p. 403-409, 1993.

ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J.P. In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and-diestrus. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 25-38, 1997.

ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J.P. Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 51, p. 203-208, 1997.

PAPAVASILIOU, P.S.; COTZIAS, G.C.; DÜBY, S.E. et al. Levodopa in parkinsonism: potentiation of central effects with a peripheral inhibitor. **New England Journal of Medicine**, v. 286, n. 1, p. 8-14, 1972.

PHILLIPS, W.E.J.; MILLS, J.H.L.; CHARBONNEAU, S.M. et al. Subacute toxicity of pyridoxine hydrochloride in the beagle dog. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 323-333, 1978.

RAINS, C.P.; BRYSON, H.M.; FITTON, A. Cabergoline: a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of hyperprolactinemia and inhibition of lactation. **Drugs**, v. 49, n. 2, p. 255-279, 1995.

RIJNBEKRK, A.D.; KOOISTRA, H.S. **Clinical endocrinology in female domestic dogs and cats: an illustrated text**. Schlutersche, 2010.

RUFO, J. G.; GAZZANO, A.; MARITI, C. Prolactin in female domestic dogs. **Matheus Journal of Veterinary**, v.1, n.1, 2016. Disponível em: <http://www.matheusopenaccess.com/PDF/Veterinary/M_J_Vetr_1_1_006.pdf> . Acessado em: 07 de jan. 2017.

SHILLE, V.M.; THATCHER, M.J.; SIMMONS, K.J. Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 184, n. 12, p. 1469-1473, 1984.

SHINDE, S.; KRISHNAPPA, B.; KUMAR, B. et al. Induction of fertile estrus in bitch (pug) with cabergolin—a case report. **International Journal of Veterinary Science**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2014.

SINHA, Y.N. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 3, p. 354-369, 1995.

SMITH, M.S.; MCDONALD, L.E. Serum levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle, pseudopregnancy and pregnancy in the dog. **Endocrinology**, v. 94, n. 2, p. 404-412, 1974.

SOKOLOWSKI, J.H.; STOVER, D.G.; VANRAVENSWAAY, F. Seasonal incidence of estrus and interestrus interval for bitches of seven breeds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 3, p. 271-273, 1977.

SONGSASEN, N.; NAGASHIMA, J.; THONGKITTIDILOK, C. Endocrine and paracrine controls of canine follicular development and function. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. S2, p. 29-34, 2017. Disponível em: <<http://leg.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Farmacologia%20da%20neurotransmissao%20dopaminergica.pdf>>. Acessado em 10 de jun. 2017.

THORNER, M. O. The anterior pituitary. **Williams textbook of endocrinology**, p. 249-340, 1998.

TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 39, p. 269-275, 1988.

TSUTSUI, T.; KIRIHARA, N.; HORI, T.; CONCANNON, P.W. Plasma progesterone and prolactin concentrations in overtly pseudopregnant bitches: a clinical study. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1032-1038, 2007.

VAN HAAFTEN, B.; DIELEMAN, S.J.; OKKENS, A.C. et al. Induction of oestrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 39, n. Suppl., p. 330-331, 1989.

VANDERLIP, S.L.; WING, A.E.; FELT, P. et al. Ovulation induction in anestrus bitches by pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. **Laboratory Animal Science**, v. 37, n. 4, p. 459-464, 1987.

VELDMAN, R.G.; FRÖLICH, M.; PINCUS, S.M. et al. Basal, pulsatile, entropic, and 24-hour rhythmic features of secondary hyperprolactinemia due to functional pituitary stalk disconnection mimic tumoral (primary) hyperprolactinemia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 4, p. 1562-1567, 2001.

VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K.; SILVA, L.; CONCANNON, P. Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in dogs by

administration of purified pig LH. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 111, n. 1, p. 35-40, 1997.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; SILVA, L.; CONCANNON, P. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. **Theriogenology**, v. 51, n. 3, p. 597-611, 1999.

VIEIRA, J.G.H. Macroprolactinemia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 45-50, 2002.

VOITH, V. L. Functional significance of pseudocyesis. **Modern Veterinary Practice**, v. 61, n. 1, p. 75-77, 1980.

VOLKMANN, D.H.; KUTZLER, M.A.; WHEELER, R. et al. Failure of hCG to support luteal function in bitches after estrus induction using deslorelin implants. **Theriogenology**, v. 66, n. 6, p. 1502-1506, 2006.

VOLPATO, R.; ARAUJO, M.S.; TSUNEMI, M.H. et al. Caracterização microbiológica e perfil de resistência das bactérias isoladas do útero de cadelas com piometra aberta e fechada. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, p. 100-104, 2014. Disponível em: <http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf12_2014/100-104.pdf>. Acessado em: 17 fev 2017.

WANKE, M.M.; FARINA, J.; LOZA, M.H. et al. Induction of estrus in bitches with normal and persistent anestrus using human menopausal gonadotropin (hMG). **Theriogenology**, v. 47, n. 4, p. 935-942, 1997.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWANO, Y. et al. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 47, p. 227-229, 1993.

ANEXO

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é consentido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz

Orientações Gerais

Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de Publicação on-line do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.

Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e depublicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.

Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em

separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em “Figure or Image” (Step 6).

É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.

O ABMVZ comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Conmittee” (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências. O número de Referências não deve exceder a 30.

Formatação do texto

O texto NÃO deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título. Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Autores e Afiliação. Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail

paracorrespondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step6), em arquivo Word.

□ Resumo e Abstract. Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

□ Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco e no mínimo duas*.

* na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

□ Introdução. Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

□ Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA. (verificar o Item Comitê de Ética).

□ Resultados. Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

□ Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

□ Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota:

□ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).
- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, SEM revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas.

Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, adaptadas para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

□ A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

□ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);

□ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974); □ mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979); □ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

□ **Citação de citação.** Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas

Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

□ **Comunicação pessoal.** Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores et al.):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88. FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia geral do cão. Not. Med. Vet., n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores et al.):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA

VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. Anais... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97.

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6ªed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e decarne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores et al.):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/>

[MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/](http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/)>. Acessado em: 5 dez. 1994.