

Citologia vaginal de preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*)¹

Paola Pereira das Neves Snoeck^{2*}, Amélia de Cássia Bezerra da Cruz³,
Lílian S. Catenacci^{4,5,6} e Camila Righetto Cassano⁴

ABSTRACT.- Snoeck P.P.N., Cruz A.C.B., Catenacci L.S. & Cassano C.R. 2011. [Vaginal cytology of maned sloth (*Bradypus torquatus*).] Citologia vaginal de preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(3):271-275. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-900, Brazil. E-mail: paolasnoeck@uesc.br

Maned sloths (*Bradypus torquatus*) are arboreal mammals of the family Bradypodidae. They can be only found in the Atlantic coast forest of Brazil and its most genetically diverse populations occur in forests of southern Bahia. The observation of these animals in the wild is very difficult as they spend most of their lifetime hidden in the dense forest canopy. Data on their reproductive aspects are scarce, and there is none information about their estrous cycle. This research aimed at identifying the vaginal epithelial cells of maned sloths (*Bradypus torquatus*) as a possible way to study the phases of the estrous cycle of this animal. The samples for vaginal cytology were obtained from four free ranging maned sloths living in a protected area of coastal forest in the South of Bahia. The sterile gynecological brush was inserted up to the necessary distance to reach the pelvic channel. For each sample two smears were made by rotating the tip of the brush onto each glass slide, producing in general three linear impressions. Staining was performed using rapid Panotic Kit (Laborclin®). Maned sloths BT033, BT065, and BT042 presented, *respectively*, 30%, 33%, and 7% of parabasal epithelial cells (PB); 56%, 22%, and 10% of small intermediate cells (IP); 6%, 18%, and 6% of large intermediate cells (IG); 2%, 13%, and 24% of superficial epithelial cell with a nucleus (SN); 6%, 14%, and 53% of anucleated superficial epithelial cell (AS). Two cell samples were collected for maned sloth BT464 with a 13 months interval. Cytological differences were observed between the two samples (1st and 2nd): 6% and 17,5% of PB cells, 5% and 25% of IP cells, 11% and 15,5% of IG cells, 8% and 19,5% of SN cells and 70% and 22,5% of AS cells, respectively. It's interesting to remark that the percentage of vaginal epithelial cells varied among sloths and also for the same animal. This result suggests that vaginal cytology of maned sloth can be used as a tool to evaluate of estrous cycle.

INDEX TERMS: Vaginal epithelial cells, reproduction, maned sloth, *Bradypus torquatus*, Bradypodidae.

¹ Recebido em 9 de março de 2010.

Aceito para publicação em 10 de dezembro de 2010.

² Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Ilhéus-Itabuna Km16, Bairro Centro, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000, Brasil. *Autor para correspondência: paolasnoeck@uesc.br

³ Médica Veterinária Autônoma, Rua da Misericórdia 33, São Thomé de Paripe, Salvador, BA 40800-330, Brasil.

⁴ Instituto de Estudos Socioambientais do Sul da Bahia (IESB), Rua Araujo Pinho 72, 3º andar, Centro, Ilhéus, BA 45653-145.

⁵ Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Cinobelina Elvas, Rodovia BR 135, Km 3, Bom Jesus, PI 64900-000, Brasil.

⁶ Centre for Research and Conservation, Royal Zoological Society of Antwerp, CRC-RZSA, Belgium.

RESUMO.- As preguiças-de-coleira (*Bradypus torquatus*) são mamíferos arborícolas da família Bradypodidae. Podem ser encontradas nos trechos de Mata Atlântica do Brasil e a maior diversidade genética de suas populações ocorre em matas do sul da Bahia. A observação desses animais na natureza é muito difícil, pois passam a maior parte da vida escondidos no denso emaranhado das copas, por isso, dados sobre aspectos reprodutivos são escassos e não existem informações sobre ciclo estral dessa espécie. Este trabalho teve por objetivo identificar as células do epitélio vaginal da preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*) como forma de viabilizar o uso dessa técnica para estudar as fases do ciclo estral desses animais. As amostras para citologia

vaginal foram obtidas de quatro preguiças de coleira que habitavam áreas de Mata Atlântica do sul da Bahia. Após captura manual do animal, procedeu-se a coleta de material biológico, introduzindo uma escova ginecológica estéril, na comissura dorsal da vulva. Para cada amostra foram feitos dois esfregaços rotacionando a extremidade da escova sobre cada lâmina de vidro, fazendo-se em geral três impressões lineares. O esfregaço foi imediatamente corado pelo método Panótico rápido (Laborclin®). Nas preguiças BT033, BT065 e BT042 foi possível identificar respectivamente 30%, 33% e 7% de células parabasais (PB); 56%, 22% e 10% de células intermediárias pequenas (IP); 6%, 18% e 6% de células intermediárias grandes (IG); 2%, 13% e 24% de células superficiais nucleadas (SN); 6%, 14% e 53% de células superficiais anucleadas (SA). Na preguiça BT464 foi possível fazer duas coletas com intervalo de 13 meses. Os dados da primeira e segunda coleta foram, respectivamente: 6% e 17,5 de células PB, 5% e 25% de células IP, 11% e 15,5% de células IG, 8% e 19,5% de células SN e 70% e 22,5% de células SA. Enfatiza-se que as porcentagens de células do epitélio vaginal variaram entre indivíduos e também na mesma preguiça. Isto sugere que a citologia vaginal possa ser uma ferramenta de avaliação do ciclo estral em preguiça-de-coleira.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Células do epitélio vaginal, reprodução, preguiça-de-coleira, *Bradypus torquatus*, Bradypodidae.

INTRODUÇÃO

As preguiças-de-coleira (*Bradypus torquatus*) são mamíferos arborícolas (Classe Mammalia), pertencentes à Ordem Pilosa. A espécie está ameaçada de extinção em consequência da redução e fragmentação de seu habitat original, podendo ser encontrada em fragmentos de Mata Atlântica do sul de Sergipe ao norte do Rio de Janeiro. Populações importantes da espécie estão presentes em matas do sul da Bahia onde foi detectada a maior diversidade genética para a espécie (Lara-Ruiz & Chiarello 2005).

Devido ao seu comportamento conspicuo, há dificuldade de observação desses animais na natureza. Dados sobre aspectos reprodutivos desta espécie, portanto são escassos. Sabe-se que o acasalamento entre as preguiças de coleira concentra-se entre os meses de agosto e outubro (Dias et al. 2009), no fim da seca e início da estação chuvosa. A gestação é de aproximadamente seis meses com intervalo entre partos de aproximadamente 12 meses. Em animais observados no Espírito Santo, os nascimentos concentraram-se entre Fevereiro e Julho (Lara-Ruiz et al. 2005, Dias et al. 2009). Cada filhote que nasce é amamentado durante quatro meses, mas vive no dorso da geradora entre nove e onze meses de idade, quando sofre dispersão.

A citologia vaginal esfoliativa é um método simples de monitoração das diversas fases do ciclo estral (England & Concannon 2002). Esta técnica, fácil e de baixo custo, consiste na pesquisa de diferentes células do epitélio vaginal e é usada normalmente para determinar as fases do ciclo estral em cadelas e gatas (Johnston et al. 2001), a

fim de predizer o melhor momento para realização da cópula ou inseminação artificial. Algumas pesquisas têm sido realizadas com ursos panda (Durrant et al. 2002, Durrant et al. 2006), leões africanos (Silva et al. 2006), caititus (Lima Neto & Nogueira Filho 2002), tamanduás (Soboll 2008) e cachorro do mato (Monteiro et al. 2002). Todas buscaram observar se houve a existência de um mesmo padrão citológico encontrado em cães e gatos e identificar o melhor momento para realizar reprodução assistida *ex situ* nessas espécies.

Este trabalho teve por objetivo identificar as células do epitélio vaginal da preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*) como forma de viabilizar o uso dessa técnica em estudos das fases do ciclo estral desse táxon, no intuito de auxiliar no manejo reprodutivo da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Para esta pesquisa utilizamos material biológico de quatro preguiças-de-coleira (Fig. 1A) de vida livre, habitantes de remanescentes florestais localizados em propriedades no entorno da Reserva Biológica de Una-REBIO-Una, município de Una, Bahia, monitoradas através de radiotelemetria (radio-transmissores Biotrack®, receptores Telonics®), para o desenvolvimento do projeto de pesquisa “Ecologia da preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*) no sul da Bahia”, com autorização e licença do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA, Licença no. 02001.007588/2002-18).

As preguiças foram capturadas no dossel da árvore através de contenção manual, sendo então, remanejadas ao chão próximo à árvore para identificação: BT033, BT042, BT065 e BT464; seguidamente obtivemos a coleta das amostras para citologia vaginal, através de esfregaços vaginais utilizando-se de dois diferentes materiais: swab vaginal estéril e escova ginecológica estéril.

Para o esfregaço vaginal separou-se os lábios vulvares (Fig.1B) gentilmente com uma mão e com a outra se conduziu o swab vaginal ou a escova ginecológica estéril (Fig.1C), a qual foi passada através da comissura dorsal da vulva; e inserida até a distância necessária para atingir o canal pélvico (Fig.1D). Uma única amostra foi coletada dos três primeiros indivíduos e duas amostras foram coletadas do quarto, com intervalo de treze meses entre as coletas.

Após a coleta de material biológico, biometrias e manutenção dos radio-transmissores, os animais foram soltos imediatamente na base da árvore onde foram capturados.

Para cada amostra foram feitos dois esfregaços rotacionando a extremidade da escova sobre cada lâmina de vidro, fazendo-se em geral três impressões lineares. O esfregaço foi imediatamente corado pelo método Panótico rápido (Laborclin®) e transportado para o laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) para avaliação diferencial das células, a qual foi baseada no trabalho de Schutte (1967). Foram contadas 200 células por lâmina avaliada. Os dados foram analisados de forma descritiva, de acordo com os aspectos morfológicos dos diferentes tipos celulares encontrados no epitélio vaginal, em decorrência do pequeno número de amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as primeiras tentativas de coleta e avaliação da citologia vaginal da preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*)



Fig.1. (A) A preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*). (B) A identificação da vagina. (C) O modelo da escova ginecológica. (D) A introdução da escova ginecológica.

não foi possível a identificação dos diferentes tipos celulares. Acredita-se que a dificuldade encontrada tenha sido em decorrência do uso de swab vaginal como método de coleta. Posteriormente, o método de coleta foi substituído pela escova ginecológica estéril, o que possibilitou a identificação e avaliação das células do epitélio vaginal.

Foram identificados cinco tipos celulares distintos durante avaliação microscópica. Nas preguiças BT033, BT065 e BT042 foi possível identificar respectivamente 30%, 33% e 7% de células parabasais (PB); 56%, 22% e 10% de células intermediárias pequenas (IP); 6%, 18% e 6% de células intermediárias grandes (IG); 2%, 13% e 24% de células superficiais nucleadas (SN); 6%, 14% e 53% de células superficiais anucleadas (SA). Na preguiça BT464 foi possível fazer duas coletas. Os dados da primeira e segunda coleta foram, respectivamente: 6% e 17,5 de células PB, 5% e 25% de células IP, 11% e 15,5% de células IG, 8% e 19,5% de células SN e 70% e 22,5% de células SA (Quadro 1).

As células parabasais (Fig.2A), apresentaram-se morfológicamente pequenas, arredondadas, com núcleo grande e pequena quantidade de citoplasma, geralmente uniformes em tamanho e formato, medindo entre 4 e 8mm. Essas células são normalmente encontradas na fase de anestro, no início do proestro e no diestro de acordo com Johnston et al. (2001). As células intermediárias são maiores do que as parabasais, medindo entre 10 e 15mm, normalmente variam em tamanho dependendo da quantidade de citoplasma presente. Nas lâminas foram identificadas células intermediárias pequenas (Fig.2B) e grandes (Fig.2C), sendo que estas se apresentavam com núcleo menor e maior quantidade de citoplasma. Esse tipo celular aparece, no ciclo estral de cadelas no proestro, no diestro e também no anestro, principalmente as células intermediárias pequenas (Johnston et al. 2001).

As células superficiais apresentavam-se de duas formas: nucleadas e anucleadas (Fig. 2D). Estas últimas foram as maiores células encontradas, medindo entre 15 e

Tabela 1. Porcentagem dos diferentes tipos celulares obtidos da citologia vaginal de preguiças-de-coleira

Preguiça	Data de coleta	Peso Kg	Parabasal	Intermediária pequena	Intermediária grande	Superficial nucleada	Superficial anucleada
BT033	Maio/06	5,7	30%	56%	6%	2%	6%
BT464	Maio/06	5,8	6%	5%	11%	8%	70%
BT464	Junho/07	7,0	17,5%	25%	15,5%	19,5%	22,5%
BT065	Junho/07	-	33%	22%	18%	13%	14%
BT042	Junho/07	7,3	7%	10%	6%	24%	53%

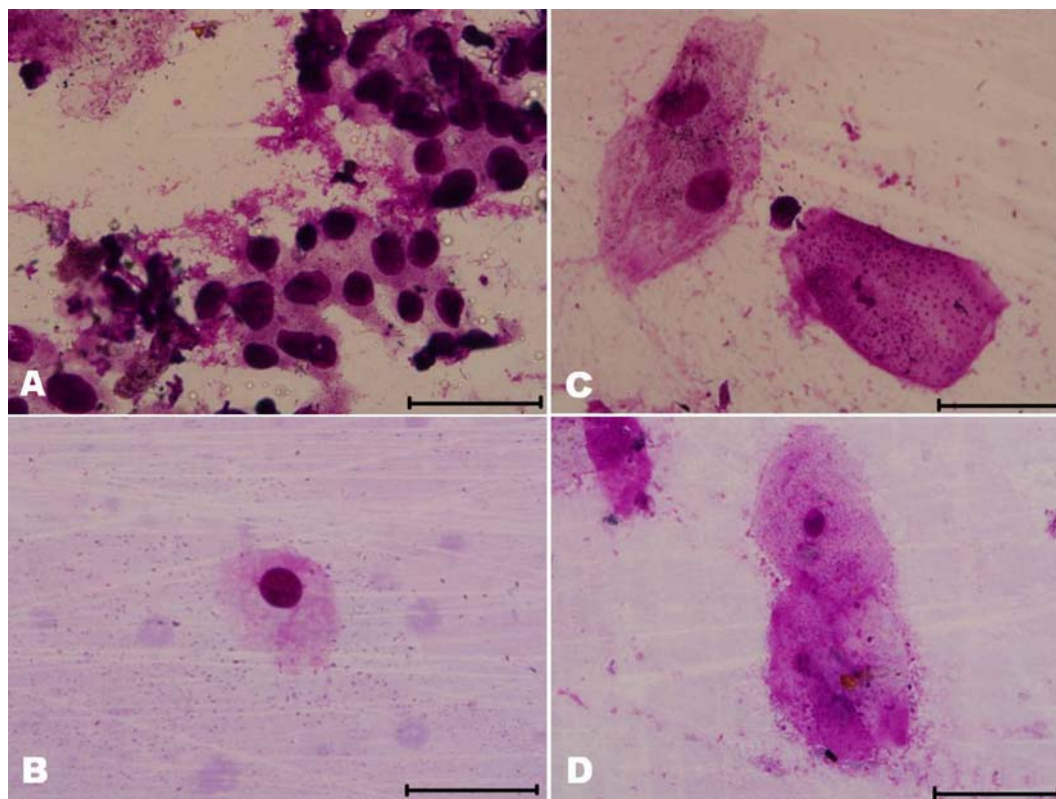


Fig.2. Citologia vaginal de preguiça-de-coleira. (A) Presença de células parabasais. (B) Célula intermediária pequena. (C) Duas células intermediárias grandes e uma célula superficial anucleada. (D) Duas células superficiais com e sem núcleo. 1000x. Barra: 10mm.

20mm, apresentando bordas irregulares, com dobras sobre si mesmas e com alto grau de queratinização, característica de morte celular (Schutte 1967, Feldman & Nelson 1987, Henson 2003, Allison et al. 2009). O período de estro é caracterizado por uma predominância desse tipo celular no epitélio vaginal de cadelas e gatas (Johnston et al. 2001).

Durante o período experimental foram analisadas lâminas com características citológicas de estro ou fase folicular do ciclo estral (proestro e estro), sendo visualizada a predominância de células do tipo superficial nucleada e anucleada, como a exemplo das preguiças BT464 (1ª lâmina, maio de 2006) e BT042, bem como lâminas com característica de fase luteal do ciclo estral (diestro) ou anestro, com predominância de células do tipo parabasal e intermediária pequena, como a exemplo das preguiças BT033 e BT065.

O aumento da porcentagem de células superficiais durante o estro e o aumento da porcentagem de células parabasais e intermediárias durante a fase luteal e no anestro foi relatado por Finlayson et al. (2006), durante experimento com fêmeas *Lasiurhinus latifrons*, um tipo de marsupial, abundante do semi-árido do sul e oeste da Austrália.

Na preguiça BT464 foi possível fazer duas coletas com intervalo de 13 meses. Foram observadas diferenças citológicas entre a primeira e segunda coleta. Esse resultado foi sugestivo que a citologia vaginal da preguiça-de-coleira pode ser uma ferramenta de avaliação do ciclo estral. Na

primeira coleta, o padrão citológico foi sugestivo de fase folicular, final do proestro e início de estro (Fig.2C,D), enquanto que na segunda coleta, a citologia vaginal apresentou padrão de diestro (Fig.2A,B). No entanto, os resultados obtidos não permitiram a determinação das fases e duração do ciclo estral dessa espécie, pois não foi possível a coleta seriada de amostra, em decorrência dos animais estarem *in situ*. Porém, o resultado demonstrou a presença de células semelhantes ao padrão encontrado na citologia de cadelas e gatas, sendo este método amplamente utilizado para avaliações do ciclo estral nos animais domésticos (Feldman & Nelson 1987, Johnston et al. 2001, Henson 2003, Allison et al. 2009).

Em nenhuma das amostras avaliadas foi identificado a presença de neutrófilos e poucas bactérias foram encontradas por campo de observação. As porcentagens de células do epitélio vaginal variaram de uma preguiça para outra e na mesma preguiça, indicando que a citologia pode ser uma ferramenta de avaliação da duração do ciclo estral nessa espécie. Na preguiça-comum, *Bradypus variegatus*, verificou-se através de dosagem de estrógeno e progesterona nas fezes que a duração do ciclo estral é de mais ou menos 60 dias, com formação de corpo lúteo funcional após ovulação (Mühlbauer et al. 2006), o que sugere que as preguiças-de-coleira também apresentem um ciclo estral longo. Este pode ser o motivo da variação entre as porcentagens de células do epitélio vaginal entre os animais utilizados.

A biologia reprodutiva da Ordem Pilosa ainda apresenta muitas incógnitas, principalmente no que se refere ao comportamento reprodutivo e a fisiologia endócrina do ciclo estral até a gestação. Os resultados aqui apresentados sugerem que a citologia vaginal pode ser uma ferramenta para avaliar o ciclo estral de preguiças-de-coleira, sendo indicado a realização de um estudo com coleta seriada de amostras nos animais, para acompanhar a variação das diferentes formas de células, associada a dosagem de estrógeno e progesterona, de forma a elucidar esse evento associado à reprodução.

CONCLUSÕES

Programas de conservação que visem o manejo reprodutivo de espécies ameaçadas de extinção, como a preguiça-de-coleira, são de fundamental importância para a manutenção da nossa fauna. E, o conhecimento dos padrões morfofisiológicos de células vaginais é uma ferramenta útil para a elaboração deste manejo, obtendo dados que elucidem o ciclo estral desta espécie.

As fêmeas envolvidas neste estudo apresentaram padrão celular do epitélio vaginal semelhante ao encontrado em cães e gatos. Entretanto, para elucidar a duração das fases do ciclo estral e o melhor momento de acasalamento para futuras intervenções serão necessários estudos com coleta de amostras seriadas associada ou não a dosagem hormonal.

Agradecimentos.- Ao Instituto de Estudos Socioambientais do Sul da Bahia, pela logística fornecida ao trabalho; à Fundação O Boticário de Proteção à Natureza e Conservação Internacional do Brasil, pelo financiamento do projeto "Ecologia da preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*) no sul da Bahia"; ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, pela licença de coleta (no.02001.007588/2002-18); ao assistente de campo Rubens e a pesquisadora Rebeca Mascarenhas, pelo auxílio na captura dos animais; e ao Centre for Research and Conservation, Royal Zoological Society of Antwerp (CRC-RZSA, Belgium) e ao CNPq pelo fornecimento de bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

- Allison R.W., Thrall M.A. & Olson P.N. 2009. Citologia vaginal, p.378-389. In: Cowell R.L., Tyler R.D., Meinkoth J.H. & DeNicola D.B. (Eds), Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos. 3ª ed. Medvet, São Paulo.
- Dias B.B., Santos L.A.D., Lara-Ruiz P., Cassano C.R., Pinder L. & Chiarello A.G. 2009. First observation on mating and reproductive seasonality in maned sloths *Bradypus torquatus* (Pilosa: Bradypodidae). J. Ethology 27:97-103.
- Durrant B., Czekala N., Olson M., Anderson A., Amodeo D., Campos-Morales R., Gual-Sill F. & Ramos-Garza J. 2002. Papanicolaou staining of exfoliated vaginal epithelial cells facilitates the prediction of ovulation in the giant panda. Theriogenology 57:1855-1864.
- Durrant B.S., Ravida N., Spady T. & Cheng A. 2006. New technologies for the study of carnivore reproduction. Theriogenology 66:1729-1736.
- England G. & Concannon P.W. 2002. Determination of the optimal breeding time in the bitch: Basic considerations. In: Concannon P.W., England G., Verstegen J. & Linde-Forsberg C. (Eds), Recent Advances in Small Animal Reproduction. Disponível em <http://www.ivis.org> Acesso em 20.8.07
- Feldman E.C. & Nelson R.W. 1987. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. W.B. Saunders, Philadelphia, p.399-480.
- Finlayson G.R., Shimmin G.A., Taggart D.A., Skinner J.F., Gilmore A., & Paris M.C.J. 2006. Oestrus cycle of captive southern hairy-nosed wombats (*Lasiorhinus latifrons*) in South Australia. Anim. Reprod. Sci. 95:295-306.
- Henson K.L. 2003. Sistema reprodutor, p.233-263. In: Raskin R.E. & Meyer D.J. (Eds), Atlas de Citologia de Cães e Gatos. Roca, São Paulo.
- Johnston S.D., Kustritz M.V.R. & Olson P.N.S. 2001. Canine and Feline Theriogenology. Saunders Company, Philadelphia. 592p.
- Lara-Ruiz P. & Chiarello A.G. 2005. Life-history traits and sexual dimorphism of the Atlantic forest maned sloth *Bradypus torquatus* (Xenarthra: Bradypodidae). J. Zoology 267:1-11.
- Monteiro F.V., Santos M.R.C., Viana E.B., Araújo T.C.S., Verona C.E. & Fedullo L.P.L. 2002. Serial clinical, colpo-cytological and endocrinological evaluations of *Cercopithecus thomasi* bitches from the Rio de Janeiro zoo. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 39(2):93-96.
- Mühlbauer M., Duarte D.P.F., Gilmore D.P. & Costa C.P. 2006. Fecal estradiol and progesterone metabolite levels in the three-toed sloth (*Bradypus variegatus*). Braz. J. Med. Biol. Res. 39:289-295.
- Schutte A.P. 1967. Canine vaginal cytology. I. Technique and cytological morphology. J. Small Anim. Pract. 8:301-306.
- Silva G.C.O., Berbare P.E.B., Zaccariotti R.L., Corrêa S.H.R., Oliveira C.A. & Guimarães M.A.B.V. 2006. Estudo da correlação das características citológicas vaginais e os níveis séricos de estradiol e progesterona em leão africano (*Panthera leo*) mantidos em cativeiro. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 43(2):227-232.
- Soboll D.S. 2008. Avaliação do ciclo reprodutivo em três fêmeas adultas de tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) por meio da citologia vaginal. Monografia do Curso de Especialização *lato sensu* em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens e Exóticos, Universidade Castelo Branco (UCB), São Paulo. 33p.