

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

BIANCA BARCELOS MARTINS

ATIVIDADE SECRETÓRIA E HISTOLOGIA UTERINA DE CADELAS
PRÉ-PÚBERES COM ABLAÇÃO PARCIAL DO DESENVOLVIMENTO
DAS GLÂNDULAS ENDOMETRIAIS

ALEGRE – ES

2013

BIANCA BARCELOS MARTINS

**ATIVIDADE SECRETÓRIA E HISTOLOGIA UTERINA DE CADELAS
PRÉ-PÚBERES COM ABLAÇÃO PARCIAL DO DESENVOLVIMENTO
DAS GLÂNDULAS ENDOMETRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rezende Luz

ALEGRE – ES

2013

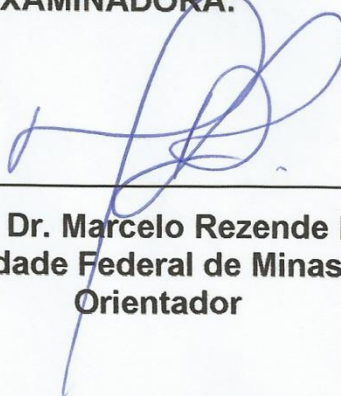
BIANCA BARCELOS MARTINS

**ATIVIDADE SECRETÓRIA E HISTOLOGIA UTERINA DE CADELAS PRÉ-
PÚBERES COM ABLAÇÃO PARCIAL DO DESENVOLVIMENTO DAS
GLÂNDULAS ENDOMETRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal.

Aprovada em 26 de agosto de 2013.

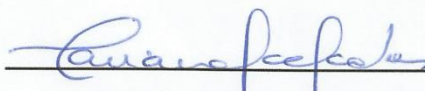
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcelo Rezende Luz
Universidade Federal de Minas Gerais
Orientador



Profª. Dra. Jeanne Broch Siqueira
Universidade Federal do Espírito Santo



Profª. Dra. Mariana Machado Neves
Universidade Federal de Viçosa

Dedico este trabalho aos meus pais,
Infância e Paulo (in memorian).

AGRADECIMENTOS

Obrigada mãe, por tudo que você me deu e me ensinou. Obrigada pela sua generosidade e simplicidade. Pelo amor incondicional, pelo carinho e afeto. Não encontro palavras que consigam te agradecer, simplesmente fico completamente envolvida por um enorme sentimento: gratidão;

Agradeço a Deus, por ter colocado pessoas especiais que me ajudaram nesta etapa da minha vida. E por ter me dado forças e vontade para a concretização deste trabalho;

A meu Orientador Dr. Marcelo Rezende Luz, pela liberdade e confiança referente ao presente trabalho;

À Professora Mariana Machado Neves pelos ensinamentos, incentivo, dedicação e ajuda no desenvolvimento do trabalho em parceria com a Universidade Federal de Viçosa (UFV);

As alunas da pós-graduação Stephanie Valente (UFV) e Dyeime Ribeiro Sousa (UFES) que me ajudaram no desenvolvimento do trabalho e pela amizade;

À Professora Louisiane de Carvalho Nunes pelo ensinamento e ajuda no desenvolvimento do trabalho;

Aos colegas da Pós-Graduação Natália Teixeira Soares, Jéssica Monteiro e Gabriela Passos por terem me proporcionado um agradável convívio me ajudando a tornar esta minha caminhada mais fácil;

As minhas irmãs, Manuela Barcelos Martins e Paula Barcelos Martins, por estarem sempre ao meu lado me dando conselhos e ajudando nos momentos mais difíceis;

As minhas sobrinhas Ana Luiza Barcelos e Ana Clara Bittencourt, por me acompanhado e ajudado na limpeza do canil. Amo vocês;

Ao meu amado namorado Walter Boschetti pelo incentivo, amor, dedicação e companheirismo;

As meus amigos Livia Simões, Rejane Alves, Jamili Suhel e Warley Gomes pela amizade e conselhos trocados;

A banca examinadora pelas considerações e conselhos para o aprimoramento do trabalho;

Ao órgão Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um
pode começar agora e fazer um novo fim”.

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

MARTINS, B.B **Atividade secretória e histologia uterina de cadelas pré-púberes com ablação parcial do desenvolvimento das glândulas endometriais** 2013. 51p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2013.

O uso de esteróides com ações no sistema reprodutor feminino pode afetar o desenvolvimento e diferenciação uterina, podendo levar a alteração no desenvolvimento das glândulas endometriais, com diminuição da eficiência reprodutiva e até mesmo esterilidade. Desta forma, esta metodologia poderia ser aplicada no controle populacional de cães. Entretanto, nos casos de inibição parcial do desenvolvimento das glândulas, não se conhece os efeitos dos esteróides sobre a funcionalidade das glândulas formadas, bem como a possível ocorrência de fibrose endometrial. Objetivou-se avaliar a atividade secretória das glândulas endometriais de cadelas pré-púberes submetidas a protocolo de ablação parcial da adenogênese uterina. Foram utilizadas dezesseis fêmeas, sem raça definida, de ninhadas diferentes, distribuídas nos grupos MPA (n = 8), fêmeas que receberam aplicações de acetato de medroxiprogesterona (10mg/kg/SC), a cada 3 semanas, desde o dia 1 após nascimento até a idade de 6 meses, e C (n = 8), fêmeas controle, não tratadas, que receberam aplicações de solução de NaCl 0,9%, de maneira similar as tratadas. Aos 6 meses de idade, foi realizada ovariectomia em todos os animais, e amostras dos cornos uterinos foram coletadas e fixadas para exame histológico e de histoquímica. Para avaliar a intensidade de secreção (graus 1-4), foram utilizadas as colorações de Periodic Acid Schiff (PAS) e Alcian Blue (AB) pH 2,5. Para a avaliação histológica foram utilizadas as colorações de Tricrômico de Masson e Azul de Toluidina. A análise estatística foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis, pelo software R, com nível de significância de 5%. Nenhuma cadela, em ambos os grupos, apresentou hiperplasia cística endometrial (HCE) e presença de conteúdo no interior do lúmen uterino. Para coloração de PAS apenas marcações graus 1 (ausente) e 2 (discreta) foram observadas em ambos os grupos, sem diferença na intensidade de secreção uterina entre grupos com relação aos graus encontrados. Entretanto, o grupo

MPA apresentou maior intensidade de secreção uterina (grau 2) em relação ao grupo C ($p < 0,05$). Com relação ao AB pH 2,5, em ambos os grupos também foram encontradas apenas marcações de graus 1 (ausente) e 2 (discreta), sem diferença estatística entre grupos com relação a intensidade de secreção uterina. Não foram observadas marcações para a coloração de Tricrômico de Masson na região periglandular, em ambos os grupos. Foi observada maior quantidade de mastócitos presentes no útero na região do miométrio em relação ao endométrio, em ambos os grupos. Conclui-se que cadelas pré-púberes com ablação parcial da adenogênese uterina apresentam mínima atividade secretória uterina, ausência de fibrose periglandular e maior presença de mastócitos no miométrio em relação ao endométrio.

Palavras-chave: acetato de medroxiprogesterona, produção de muco, cadelas

ABSTRACT

MARTINS, B.B. **Secretory activity and uterine histology of bitches prepubertal ablation with partial development endometrial glands** 2013. 51p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2013.

The use of steroids with actions in the female reproductive system may affect the development and differentiation of the uterus, which can lead to abnormal development of endometrial glands, with decreased reproductive efficiency and even sterility. Thus, this methodology could be applied in the population control of dogs. However, in cases of partial inhibition of the development of the glands is not known effects of steroids on the functionality formed glands, as well as the possible occurrence of endometrial fibrosis. This study aimed to evaluate the secretory activity of the endometrial glands of prepubertal bitches undergoing a protocol for partial ablation of endometrial glands development. We used sixteen female mongrel bitches from different litters, distributed in the MPA group (n = 8), females that received injections of medroxyprogesterone acetate (10mg/kg/SC), every 3 weeks, from day 1 after birth until the age of six months, and C (n = 8), control females, untreated, which received applications of 0.9% NaCl solution. At 6 months of age, ovariohysterectomy was performed in all animals, and samples of uterine horns were collected and fixed for histology and histochemistry. To evaluate the intensity of uterine secretion (grades 1-4), the stains of periodic acid Schiff (PAS) and Alcian Blue (AB) pH 2.5 were used. For histological analysis we used Masson's trichrome and toluidine blue staining. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test, using the R software, with significance level of 5%. No dog in both groups exhibited cystic endometrial hyperplasia (HCE) and presence of content in the uterine lumen. For PAS only the grades 1 (absent) and 2 (mild) were observed in both groups, without difference between groups. However, the MPA showed greater intensity of uterine secretion (grade 2) in comparison to the C group ($p < 0.05$). With respect to AB pH 2.5, in both groups we also found only the grades 1 (absent) and 2 (mild), without statistical difference between groups. There was no Masson's trichrome staining in the periglandular region in both groups. There was greater amount of mast cells

present in the region of the myometrium in relation to the endometrium in both groups. It is concluded that prepubertal bitches with partial ablation of uterine adenogenesis present minimal uterine secretory activity, absence of uterine periglandular fibrosis and presence of larger amount of mast cells in the myometrium in relation to the endometrium.

Keywords: medroxyprogesterone acetate, mucus production, bitch

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografias de cortes transversais do útero de cadelas pré-pubescentes tratadas com acetato de medroxiprogesterona, do nascimento aos 6 meses de idade, submetidos ao método de Tricrômico de Masson (A = grupo C, B = grupo MPA. As setas indicam as glândulas endometriais) e ao método de Azul de Toluidina (C = grupo MPA, D = grupo C. As setas indicam os mastócitos). Barra de escala = 20µm..... 37
- Figura 2.** Fotomicrografias de cortes transversais do útero de cadelas pré-pubescentes tratadas com acetato de medroxiprogesterona, do nascimento aos 6 meses de idade, submetidos ao método de PAS (E = grupo MPA, F = grupo C) e ao método de AB pH 2,5 (G = grupo MPA, H = grupo C. As setas indicam a intensidade de secreção nas glândulas endometriais). Barra de escala = 20µm..... 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição de mastócitos/mm ² no miométrio e endométrio de cadelas pré-púberes, tratadas com acetato de medroxiprogesterona do nascimento aos seis meses de idade, pela coloração de Azul de Toluidina.....	39
Tabela 2.	Medianas das intensidades (graus 1 e 2) de marcação no útero de cadelas pré-púberes, tratadas com acetato de medroxiprogesterona do nascimento aos seis meses de idade, pelas colorações de PAS e AB pH 2,5.....	40

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

P4 - Progesterona

E2 - Estradiol

EL - Epitélio Luminal

EG - Epitélio Glandular

PAS – Peridic acid schiff

AB pH 2,5 – Alcian Blue pH 2,5

µm - Micrômetro

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Morfofisiologia uterina.....	18
2.2 Endométrio.....	19
2.3 Miométrio.....	19
2.4 Perimétrio.....	20
2.5 Glândulas endometriais.....	20
2.6 Produção de muco.....	21
2.7 Efeitos dos progestágenos sobre o desenvolvimento das glândulas endometriais.....	23
 3 CAPITULO 1 - ATIVIDADE SECRETÓRIA DAS GLÂNDULAS ENDOMETRIAIS DE CADELAS PRÉ-PÚBERES COM ABLAÇÃO PARCIAL DA ADENOGÊNESE UTERINA.....	 28
3.1 RESUMO.....	28
3.2 ABSTRACT.....	30
3.3 INTRODUÇÃO.....	32
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.4.1 Animais.....	33
3.4.2 Coleta e processamento das amostras.....	33
3.4.3 Análise histoquímica em microscopia de luz.....	34
3.4.3.1 Periodic Acid Schiff (PAS)	34
3.4.3.2 Alcian Blue pH 2,5.....	35
3.4.3.3 Tricrômico de Masson.....	35
3.4.3.4 Azul de Toluidina.....	35
3.4.4 Análise Estatística.....	36

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.6 CONCLUSÃO.....	42
3.7 AGRADECIMENTOS.....	42
3.8 REFERÊNCIAS.....	42
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
5. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Em mamíferos, o útero é um órgão que possui como principais funções receber o embrião e manter o desenvolvimento do embrião/feto durante a gestação (SPENCER et al., 2005). A parede é relativamente espessa e constituída por três túnicas ou camadas: perimétrio (externa), miométrio (intermediária) e endométrio (interna) (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). O endométrio passa por mudanças morfológicas precisas sob o controle dos hormônios esteróides sexuais, estrógenos e progesterona (VERMEIRSCH et al., 1999; VERMEIRSCH et al., 2000).

Glândulas endometriais estão presentes no endométrio, e desempenham a importante função de sintetizar substâncias importantes para a sobrevivência do embrião (GRAY et al., 2001). Elas têm o sistema de produção de muco, permitindo o trânsito de espermatozóides durante o estro e protegendo o útero contra infecções ascendentes (BECHER et al., 2004).

O muco é uma secreção mista de moléculas de mucina, íons, água e compostos antimicrobianos. Apesar de o muco ser principalmente um gel viscoso, também contém uma grande variedade de enzimas, peptídeos e imunoglobulinas que servem para proteger as células epiteliais do sistema respiratório, gastrointestinal, urogenital, óptico e sistema auditivo (HAYNES; TIGHE; DUA, 1999; CUNLIFFE; MAHIDA, 2004; ROGAN et al., 2006). As mucinas são os principais constituintes do muco, e exercem o papel de hidratação, lubrificação e proteção (CARLSTEDT, 1985).

Sob o estímulo da progesterona luteal, o endométrio sofre hipertrofia e hiperplasia, com aumento no número e no tamanho de suas glândulas, e consequente aumento da atividade secretora, e acúmulo de fluido estéril no lúmen do útero. Com o uso de progestágenos exógenos, usados como contraceptivos em cadelas, essas respostas hormonais podem ser mais exarcebadas (DE BOSSCHERE et al., 2001; RAGNI, 2005; PRETZER, 2008). Além disso, o uso de esteróides, com ação no sistema reprodutor feminino em períodos críticos do desenvolvimento e diferenciação uterina, pode levar a alteração no desenvolvimento das glândulas endometriais, causando

diminuição da eficiência reprodutiva ou até mesmo esterilidade (GRAY et al., 2001).

Várias espécies de animais que receberam esteróides sistêmicos nas primeiras semanas ou meses de vida apresentam diminuição da eficiência reprodutiva ou mesmo esterilidade (GRAY et al., 2001), o que poderia representar uma metodologia aplicável ao controle populacional de cães. Suínos pré-púberes expostos a valerato de estradiol não apresentaram alterações nas taxas de ovulação, porém o tratamento hormonal afetou a sobrevivência embrionária nas fêmeas adultas (BARTOL et al., 1993). Já em ovinos, a exposição crônica à progesterona exógena desde o nascimento até à puberdade causa a ablação total das glândulas endometriais, tornando animais “*knockout*” para glândulas uterinas as ovelhas adultas (*uterine gland-knockout* - UGKO) (BARTOL et al., 1997). Bezerras recém-nascidas que receberam implantes de progesterona e benzoato de estradiol apresentaram redução da área miometrial e endometrial, e ablação parcial do desenvolvimento das glândulas endometriais (BARTOL et al., 1995). Semelhantemente, cadelas tratadas com acetato de medroxiprogesterona do nascimento até os 6 meses de idade apresentaram ablação parcial das glândulas uterinas (TEIXEIRA, 2012). Todavia, em nenhum destes estudos foi avaliada a atividade secretória das glândulas endometriais formadas, a despeito do tratamento com esteróides no período pré-púbere.

Assim, objetivou-se avaliar a atividade secretória das glândulas endometriais de cadelas pré-púberes submetidas a protocolo de ablação parcial da adenogênese uterina, por meio de técnicas histoquímicas e histológicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfofisiologia uterina

O útero é o órgão do sistema reprodutor feminino que desempenha funções essenciais à reprodução em mamíferos de diferentes espécies. Na gestação, é responsável pela implantação, desenvolvimento embrionário e fetal, e aumenta seu volume significativamente, retornando ao tamanho normal após o parto (HAFEZ, 1993). É constituído morfológicamente, nas fêmeas domésticas, por dois cornos, um corpo e um colo ou cérvix (HAFEZ, 1995; YIN; MA, 2005). Histologicamente, sua parede é constituída por três túnicas ou camadas: mucosa ou endométrio (interna), muscular ou miométrio (intermediária) e serosa ou perimétrio (externa) (MAXIMOW; BLOOM, 1957; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O sistema reprodutor feminino está sujeito a alterações cíclicas que se manifestam macro e microscopicamente, além de manifestações comportamentais (ALTMAN, 2004). O ciclo estral proporciona ao útero e principalmente ao endométrio alterações morfológicas e funcionais devido à influência de hormônios ovarianos (OEHLER; REES; BICKNELL, 2000). Na maioria das espécies domésticas, os estrógenos predominam no ambiente folicular pré-ovulatório (FARSTAD, 2000), todavia em cadelas, ocorre luteinização pré-ovulatória dos folículos, e a concentração plasmática de progesterona (P₄) aumenta durante o proestro (CONCANNON; HANSEL; VISEK, 1975; CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989). Com o aumento circulante dos estrógenos, o endométrio se torna hiperplásico, tendo uma maior vascularização, maior fluxo sanguíneo e maior atividade metabólica, além de ter dilatação e relaxamento da cérvix, bem como migração de leucócitos polimorfonucleares para o lúmen uterino. Por outro lado, o aumento da concentração plasmática de P₄ promove proliferação e aumento da atividade secretória das glândulas endometriais, fechamento da cérvix, inibição da contratilidade do miométrio, além de possuir um efeito supressor da imunidade celular, por impedir a migração leucocitária para o lúmen uterino (VERMEIRSCH et al., 1999; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

2.2 Endométrio

O epitélio de revestimento do endométrio é cilíndrico simples (revestimento interno do lúmen uterino) formadas de células ciliadas e de células secretoras (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004), porém áreas de epitélio pseudoestratificado colunar podem ocorrer na porca e nos ruminantes, assim como focos isolados de epitélio cuboidal (BANKS, 1992). Além de revestir, o epitélio também contém inúmeras glândulas tubulares simples, denominadas glândulas endometriais, que secretam muco e lipídeos. O endométrio apresenta a camada superficial da lâmina própria constituída por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado, com inúmeros fibroblastos, macrófagos e mastócitos. A partir do sangue, eosinófilo e linfócitos penetram a lâmina própria (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Além da camada superficial, é constituído por camada profunda da lâmina própria que consiste também em um tecido conjuntivo frouxo, porém com poucas células (BANKS, 1992; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MAXIMOW; BLOOM, 1957).

Em muitas fêmeas pré-púberes, o endométrio apresenta-se imaturo, com poucas glândulas presentes no estroma e o miométrio encontra-se ainda pouco desenvolvido (REHM et al., 2007). Da mesma forma, o útero de cadelas é desprovido de glândulas endometriais ao nascimento, as quais começam a se desenvolver a partir dos 15 dias, e após 60 dias do nascimento a cadela possui estrutura histológica uterina similar ao de uma fêmea adulta (RAMOS et al., 2012). As características histológicas do útero de uma fêmea imatura e de uma fêmea em anestro são semelhantes (CHANDRA; ADLER, 2008).

2.3 Miométrio

O miométrio é formado por uma espessa camada de fibras musculares lisas, e se divide em uma camada circular interna e uma camada longitudinal externa que sofrem hipertrofia e hiperplasia durante a gestação. Sendo responsável pela capacidade de expansão e contractilidade uterina. Entre essas duas camadas, ou profundamente na camada circular interna, localiza-se o estrato vascular que é composto de grandes artérias, veias e vasos linfáticos,

os quais têm comunicação com o endométrio (MAXIMOW; BLOOM, 1957; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Durante a gestação muitas células musculares lisas, adquirem características ultra-estruturais de células secretoras de proteínas e sintetizam ativamente colágeno, cuja a quantidade aumenta significadamente no útero (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

2.4 Perimétrio

O perimétrio é constituído por tecido conjuntivo frouxo revestido pelo mesotélio peritoneal, células musculares lisas e inúmeros vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fibras nervosas. O perimétrio fornece a ligação do útero aos ligamentos uterinos, promovendo assim o suporte uterino. É responsável por revestir e proteger o útero (MAXIMOW; BLOOM, 1957; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004)

2.5 Glândulas endometriais

As glândulas endometriais são estruturas presentes no endométrio de todos os mamíferos, as quais têm como funções sintetizar, secretar e transportar substâncias essenciais para a sobrevivência do embrião, início de seu desenvolvimento, bem como na implantação e placentação (GRAY et al., 2001).

A idéia de que as secreções uterinas nutrem o conceito em desenvolvimento foi discutida por Aristóteles no terceiro século a.C. e por William Harvey no século XVII. Em 1882, Bonnett concluiu que as secreções das glândulas uterinas eram importantes na sobrevivência do embrião em ruminantes (SPENCER; BAZER, 2004).

O crescimento do embrião inicialmente depende do endométrio e logo após da placentação, se torna dependente da placenta. A maioria dos fatores que regulam o embrião e seu desenvolvimento origina-se das glândulas endometriais, a partir de suas secreções, ou resultam do aumento do diâmetro e número de vasos sanguíneos uterinos importantes para nutrição do feto

(SPENCER; BAZER, 2004). Estudos com primatas demonstraram que as secreções das glândulas endometriais são reguladoras primárias da sobrevivência e desenvolvimento embrionário, desempenhando importante papel na produção de sinais para implantação, placentação e reconhecimento materno da gestação (BAZER; ROBERTS; THATCHER, 1979; GRAY et al., 2001).

A formação das glândulas endometriais começa com a diferenciação e brotação do epitélio glandular (EG) a partir do epitélio luminal (EL), a penetração do estroma uterino por tubos do EG e extenso enrolamento e ramificação do EG. Neste contexto, a formação das glândulas endometriais em humanos inicia-se no período fetal e se completa após o nascimento. Por outro lado, é primariamente um fenômeno pós-natal em ovinos, suínos e bovinos. Consequentemente, neonatos ovinos surgiram como modelos atraentes para estudos dos mecanismos que regulam estes processos (GRAY et al., 2001).

Em cadelas, a formação das glândulas endometriais inicia-se a partir dos 15 dias após o nascimento, e após 60 dias do nascimento há conformação histológica uterina similar a de um animal adulto (RAMOS, 2012). Diversas alterações estão presentes em todo o corno uterino no momento da implantação e do desenvolvimento embrionário, como espessamento do endométrio (FELDMAN; NELSON, 1996), edema das glândulas endometriais que apresentam atividade secretora aumentada (BARRAU et al., 1975), tendo nas células epiteliais a presença de glicogênio e produção de muco rico em proteínas, que sustenta o desenvolvimento inicial do embrião e proporciona a nutrição antes da placentação (SAMUEL; ALLEN; STEVEN, 1977).

2.6 Produção de muco

O muco é uma secreção mista de moléculas de mucina, íons, água, e compostos antimicrobianos, secretado por várias células e glândulas epiteliais especializadas mantendo a superfície da mucosa úmida. É um gel viscoso, que também contém uma grande variedade de enzimas e imunoglobulinas (PLUTA et al., 2011). Desempenha papel importante na função reprodutiva e de defesa do sistema reprodutor, e sofre alterações bioquímicas e físicas de acordo com

as concentrações plasmáticas de estrógenos e progesterona (WOLF, 1978; HAFEZ, 1980).

As características do muco são importantes na fertilidade. Nas diferentes fases do ciclo estral, as elevadas concentrações de estrógenos e/ou progesterona influenciam essas glândulas a produzirem muco viscoso, que impede a passagem de microrganismos e de espermatozóides para dentro da cavidade uterina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A mucina é um composto pertencente a um grupo de glicoproteínas que são as principais constituintes do muco. As moléculas de mucinas possuem alto peso molecular (> 250 kDa) e apresentam em sua composição 20% de proteína e 80% de carboidratos (CARLSTEDT, 1985). Se situam na parte superficial das células de vários tipos de tecidos epiteliais, como nas vias respiratórias, trato gastrointestinal, sistema reprodutor e glândulas acessórias, onde exercem o papel de hidratação, lubrificação e proteção. Portanto, suas propriedades vão além dessas funções primárias, dado que mucinas também estão envolvidas em processos biológicos complexos como renovação, diferenciação, sinalização e adesão celulares, fertilização, infecções e inflamações (BROCKE; KUNZ, 2002; WINTERFELD; KHODAIR; SCHMIDT, 2003; ANDRIANIFAHANAMA; MONIAUX; BATRA, 2006; BUSCAGLIA et al., 2006; GEIGER et al., 2007).

Estudos avaliando a fração protéica da molécula da mucina encontraram diferenças na disposição dos aminoácidos ao longo da proteína (WRESCHNER et al., 1990; DEKKER et al., 2002). Quanto à fração glicídica de sua molécula, as mucinas podem ser divididas em dois grandes grupos, representadas pelas mucinas neutras, ricas em glicogênio, e ácidas, ricas em ácido siálico ou radicais sulfatados (SPICER; LEPPI; STOWARD, 1965; LEPPI; SPICER, 1966).

A fração glicídica das mucinas neutras é composta, principalmente, por glicogênio e recebem essa denominação, por possuírem pequena quantidade de ácido siálico na composição (menos de 1mol%), além de alta concentração molecular de frutose, galactose e n-acetilglucosamina, e pequena quantidade de ácido siálico e n-acetilgalactosamina. A fração protéica das mucinas neutras é formada principalmente pelos aminoácidos serina, aspartato e alanina. De maneira diferente, as mucinas ácidas possuem na sua fração glicídica grande

quantidade de ácido siálico (mais que 10mol%). A fração glicídica é composta principalmente por glucosamina, galactosamina e frutose. Dividem-se em dois subgrupos representados pelas sulfomucinas e sialomucinas segundo a predominância de radicais sulfatados ou de ácido siálico, respectivamente, na sua porção glicídica. Quando se analisa a fração protéica das mucinas ácidas, a prolina, treonina e glicina são os aminoácidos mais presentes (GOLD; SHOCHAT; MILLER, 1981).

2.7 Efeitos dos progestágenos sobre o desenvolvimento das glândulas endometriais

Os progestágenos, também chamados de progestinas, são hormônios sintéticos, com efeitos similares aos da progesterona, geralmente utilizados como drogas contraceptivas por causarem *feedback* negativo sobre o hipotálamo e a hipófise causando uma diminuição na secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que por sua vez diminui a secreção do hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), a liberação de prolactina e pode reduzir as concentrações circulantes de estrógenos, com consequente inibição do crescimento folicular e ovulação (KUTZLER; WOOD, 2006). Além disso, existem mais duas possíveis teorias sobre o mecanismo de ação, como alteração da motilidade do trato tubular, causando falha de transporte do ovócito e da fertilização e receptividade alterada do endométrio resultando em falha da implantação (MUNSON, 2006).

Altas doses de acetato de medroxiprogesterona ou de progesterona, ou a exposição repetida ou prolongada em cadelas adultas levam a quadros de hiperplasia cística endometrial, com proliferação das glândulas endometriais e dilatação cística das mesmas, com acúmulo de fluido no lúmen uterino (SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN, 1974).

O acetato de medroxiprogesterona é um progestágeno de longa ação, disponível em formulação oral ou injetável (ROMAGNOLI; SONTAS, 2010), e tem sido utilizado para suprimir o estro em cadelas com doses e frequências de aplicações distintas (ROMAGNOLI; CONCANNON, 2003). Como é lentamente metabolizado pelo fígado, suas concentrações circulantes eficazes podem ser

mantidas por 3 a 6 meses após a aplicação intramuscular (ROMAGNOLI; SONTAS, 2010). Em estudo de Beijerink et al. (2007), com fêmeas da raça Beagle, os efeitos do tratamento crônico com MPA (10 mg/kg, a cada 30 dias, num total de 13 aplicações) sobre a função adenohipofisária impediu a ocorrência de estro, ovulação, e subsequente fase luteal, por período de 12 meses, pela supressão do eixo hipotalâmico-hipofisário diminuindo a secreção do FSH e LH. Os autores observaram que o MPA não afetou a concentração basal plasmática de LH, e as concentrações basais plasmáticas de FSH foram significativamente maiores aos 2 meses após o início do tratamento, bem como aos 5, 8 e 11 meses após o início do tratamento. Fisiologicamente, o endométrio sob o estímulo da progesterona se hipertrofia devido a um aumento no número e no tamanho de suas glândulas, que aumentam suas atividades secretoras, e um fluido estéril pode se acumular no lúmen do útero. Essas respostas às ações hormonais podem ser mais exacerbadas com o uso de progestágeno exógeno (DE BOSSCHERE et al., 2001; RAGNI, 2005; PRETZER, 2008).

O uso de esteróides com ações no sistema reprodutor feminino pode afetar o desenvolvimento e diferenciação uterina, podendo levar a alteração no desenvolvimento das glândulas endometriais, com diminuição da eficiência reprodutiva e até mesmo esterilidade (GRAY et al., 2001).

Em ovinos, o tratamento com progestágenos no período pré-púbere causa ablação total do desenvolvimento das glândulas endometriais, e as ovelhas chegam a idade adulta estéreis. Em função disso um grupo de pesquisadores criou um fenótipo denominado "*uterine gland-knockout*" (UGKO), um modelo útil para o estudo do desenvolvimento do útero e do papel das glândulas endometriais na função uterina durante o ciclo estral e a gestação. As ovelhas consideradas UGKO apresentam ciclo estral alterados e não conseguem manter a gestação. Esta incapacidade da manutenção da gestação é principalmente devido a ausência de glândulas endometriais e suas secreções (muco) que são de fundamental importância para suportar o crescimento e o desenvolvimento de conceitos (GRAY et al., 2001). Além disso, a exposição à progesterona visando a ablação do desenvolvimento das glândulas endometriais nesta espécie altera a integridade estrutural e funcional do endométrio adulto, além de as fêmeas adultas apresentarem um estroma

endometrial completamente desorganizado (GRAY et al., 2000) o que as tornam inférteis.

Na espécie bovina, bezerras recém-nascidas tratadas com implantes de progesterona e benzoato de estradiol do nascimento até a puberdade, apresentaram redução da área miometrial em 23% e da área endometrial em 27%, com ablação parcial (40%) do desenvolvimento das glândulas endometriais. Portanto, a exposição de bezerras pré-puberes a estes hormônios pode causar efeitos profundos na morfologia uterina e no ambiente uterino dos animais adultos, e a extensão das alterações pode depender do período de desenvolvimento em que ocorreu a exposição aos hormônios (BARTOL et al., 1995).

A exposição de suínos neonatos a valerato de estradiol desde o nascimento até o 13º dia de vida não afetou a taxa de ovulação das fêmeas adultas, porém causou redução da sobrevivência embrionária em 22% aos 45 dias de gestação. Com isso os autores concluíram que neonatos suínos expostos a estas substâncias podem sofrer efeitos permanentes sobre a estrutura e função uterina, quando adultos (BARTOL et al., 1993).

Em equinos, Wilsher, Lefranc e Allen (2009), por meio do uso exógeno de progesterona e estrógenos desde o nascimento até os seis meses de idade em potrancas, não obtiveram bons resultados para chegar ao modelo UGKO, como utilizados em ovelhas, bovinos e suínos. Neste estudo, tanto a progesterona isoladamente, ou aplicada em associação a administrações quinzenais de valerato de estradiol não foram capazes de provocar ablação das glândulas endometriais. Pelo contrário, os hormônios exógenos utilizados estimularam sua formação. Estes autores concluíram que estrógenos ovarianos, mas não a progesterona, parecem ser o estímulo básico para a morfogênese das glândulas endometriais na espécie equina.

Em cadelas, os primeiros relatos sobre a morfogênese glandular uterina ocorreram recentemente (COOKE et al., 2012; RAMOS, 2012). Estes autores demonstraram que na espécie canina o desenvolvimento das glândulas endometriais é um processo pós-natal, ocorrendo majoritariamente entre o nascimento e o dia 60º dia de vida, além de expressarem os receptores para progesterona (PR) e estrógenos (ER). De acordo com Teixeira (2012), cadelas tratadas com aplicações seriadas de acetato de medroxiprogesterona, do

nascimento aos seis meses de idade, sofrem ablação parcial (35%) do desenvolvimento de glândulas endometriais. Todavia, não há descrição na literatura consultada sobre a atividade secretória das glândulas endometriais formadas nas espécies submetidas a tratamentos com progestágenos e/ou estrógenos, que apresentaram apenas ablação parcial do desenvolvimento glandular.

CAPÍTULO 1

ATIVIDADE SECRETÓRIA DAS GLÂNDULAS ENDOMETRIAIS DE CADELAS PRÉ-PÚBERES COM ABLAÇÃO PARCIAL DA ADENOGÊNESE UTERINA

Artigo a ser submetido à publicação.

3 Cap. 1 – ATIVIDADE SECRETÓRIA E HISTOLOGIA UTERINA DE CADELAS PRÉ-PÚBERES COM ABLAÇÃO PARCIAL DO DESENVOLVIMENTO DAS GLÂNDULAS ENDOMETRIAIS

Martins, B.B.¹; Teixeira, N.S.¹; Teixeira, S.A.M.V.²; Sousa, D.R.¹; Giannotti, J.D.G.¹; Nunes, L.C.¹; Neves, M.M.²; Luz, M.R.^{*1 3}

¹ Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo;

² Laboratório de Biologia, Universidade Federal de Viçosa;

³ Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

3.1 RESUMO

A exposição inadequada do sistema reprodutor feminino a esteróides durante períodos críticos do desenvolvimento uterino pode inibir total ou parcialmente o desenvolvimento das glândulas endometriais. Entretanto, nos casos de inibição parcial, não se conhece os efeitos dos esteróides sobre a funcionalidade das glândulas formadas, bem como a possível ocorrência de fibrose endometrial. Objetivou-se avaliar a atividade secretória das glândulas endometriais de cadelas pré-púberes submetidas a protocolo de ablação parcial da adenogênese uterina. Foram utilizadas dezesseis fêmeas, sem raça definida, de ninhadas diferentes, distribuídas nos grupos MPA (n = 8), fêmeas que receberam aplicações de acetato de medroxiprogesterona (10mg/kg/SC), a cada 3 semanas, desde o dia 1 após nascimento até a idade de 6 meses, e C (n = 8), fêmeas controle, não tratadas, que receberam aplicações de solução de NaCl 0,9%. Aos 6 meses de idade, foi realizada ovariectomia em todos os animais, e amostras dos cornos uterinos foram coletadas e fixadas para exame histológico e de histoquímica. Para avaliar a intensidade de secreção (graus 1-4), foram utilizadas as colorações de Periodic Acid Schiff (PAS) e Alcian Blue (AB) pH 2,5. Para a avaliação histológica foram utilizados Tricrômico de Masson e Azul de Toluidina. A análise estatística foi realizada

pelo teste Kruskal-Wallis, pelo software R, com nível de significância de 5%. Nenhuma cadela, em ambos os grupos, apresentou hiperplasia cística endometrial (HCE) e presença de conteúdo no interior do lúmen uterino. Apenas marcações graus 1 (ausente) e 2 (discreta) foram observadas para PAS em ambos os grupos, sem diferença na intensidade de secreção uterina entre grupos com relação aos graus encontrados. Entretanto, o grupo MPA apresentou maior intensidade de secreção uterina (grau 2) em relação ao grupo C ($p < 0,05$). Com relação ao AB pH 2,5, em ambos os grupos também foram encontradas apenas marcações de graus 1 (ausente) e 2 (discreta), sem diferença estatística entre grupos com relação a intensidade de secreção uterina. Não foram observadas marcações para a coloração de Tricrômico de Masson na região periglandular, em ambos os grupos. Foi observada maior quantidade de mastócitos presentes no útero na região do miométrio em relação ao endométrio, em ambos os grupos. Conclui-se que cadelas pré-púberes com ablação parcial da adenogênese uterina apresentam mínima atividade secretória uterina, ausência de fibrose periglandular e maior presença de mastócitos no miométrio em relação ao endométrio.

Palavras-chave: acetato de medroxiprogesterona, produção de muco, cadelas

3.2 ABSTRACT

Inadequate exposure of the female reproductive tract to steroids during the critical periods of development may totally or partially inhibit development of endometrial glands. However, in cases of partial inhibition is not known the effects of steroids on the functionality formed glands, as well as the possible occurrence of endometrial fibrosis. This study aimed to evaluate the secretory activity of the endometrial glands of prepubertal bitches undergoing a protocol for partial ablation of endometrial glands development, the occurrence of endometrial fibrosis, and the presence of mast cells in the uterus of prepubertal bitches. We used sixteen female mongrel bitches from different litters, distributed in the MPA group (n = 8), females that received injections of medroxyprogesterone acetate (10mg/kg/SC), every 3 weeks, from day 1 after birth until the age of six months, and C (n = 8), control females, untreated, which received applications of 0.9% NaCl solution. At 6 months of age, ovariohysterectomy was performed in all animals, and samples of uterine horns were collected and fixed for histology and histochemistry. To evaluate the intensity of uterine secretion (grades 1-4), the stains of periodic acid Schiff (PAS) and Alcian Blue (AB) pH 2.5 were used. For histological analysis we used Masson's trichrome and toluidine blue staining. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test, using the R software, with significance level of 5%. No dog in both groups exhibited cystic endometrial hyperplasia (HCE) and presence of content in the uterine lumen. For PAS only the grades 1 (absent) and 2 (mild) were observed in both groups, without difference between groups. However, the MPA group showed greater intensity of uterine secretion (grade 2) in comparison to the C group ($p < 0.05$). With respect to AB pH 2.5, in both groups we also found only the grades 1 (absent) and 2 (mild), without statistical difference between groups. There were no Masson's trichrome staining in the periglandular region in both groups. There was greater amount of mast cells present in the region of the myometrium in relation to the endometrium in both groups. It is concluded that prepubertal bitches with partial ablation of uterine adenogenesis present minimal uterine secretory activity, absence of uterine periglandular fibrosis and presence of larger amount of mast cells in the myometrium in relation to the endometrium.

Keywords: medroxyprogesterone acetate, mucus production, bitch

3.3 INTRODUÇÃO

As glândulas endometriais são estruturas que estão presentes no útero de todos os mamíferos, as quais têm funções de sintetizar, secretar e transportar uma mistura complexa de substâncias necessárias ao desenvolvimento e manutenção embrionária antes da placentação (GRAY et al., 2001). O muco é uma secreção constituída principalmente de mucina, como também de íons, água, e compostos antimicrobianos, secretado por várias células e glândulas epiteliais especializadas mantendo a superfície da mucosa úmida (PLUTA et al., 2011). Desempenha papel importante na função reprodutiva e de defesa do sistema reprodutor, e sofre alterações bioquímicas e físicas de acordo com as concentrações plasmáticas de estrógenos e progesterona (HAFEZ, 1980; WOLF, 1978).

Várias espécies de animais que receberam esteróides sistêmicos nas primeiras semanas ou meses de vida apresentam diminuição da eficiência reprodutiva ou mesmo esterilidade (GRAY et al., 2001), o que poderia representar uma metodologia aplicável ao controle populacional de cães. Ovelhas expostas a progestágenos no período pré-púbere tiveram ablação da formação das glândulas endometriais, exibindo um fenótipo denominado “*uterine gland-knockout*” (UGKO) (BARTOL et al., 1997). Na espécie bovina, bezerras recém-nascidas tratadas com implantes de progesterona e benzoato de estradiol, do nascimento à puberdade, apresentaram redução da área miometrial e endometrial, além da ablação parcial do desenvolvimento das glândulas endometriais (BARTOL et al., 1995).

Na espécie canina, o desenvolvimento das glândulas endometriais é um evento pós-natal, que ocorre majoritariamente entre o nascimento e o 60º dia de vida (COOKE et al., 2012; RAMOS, 2012). Similarmente ao descrito para bovinos (BARTOL et al., 1995), cadelas tratadas com acetato de medroxiprogesterona, do nascimento aos seis meses de idade, apresentam ablação parcial no desenvolvimento das glândulas endometriais (TEIXEIRA, 2012). Entretanto, não há descrição na literatura consultada sobre a atividade secretória das glândulas endometriais formadas nos animais com ablação parcial.

Assim, objetivou-se com este estudo avaliar a atividade secretória das glândulas endometriais formadas em cadelas submetidas a aplicações seriadas de acetato de medroxiprogesterona, do nascimento aos 6 meses de idade.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Animais

Dezesseis filhotes fêmeas, pré-puberes, sem raça definida, de ninhadas diferentes, no dia 1 após o nascimento, foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: Grupo acetato de medroxiprogesterona (MPA) (n= 8), que receberam aplicações subcutâneas (SC) de MPA (10 mg/kg) em intervalos de 3 semanas, desde o dia 1 após nascimento até a idade de 6 meses, para ablação parcial da adenogênese uterina (TEIXEIRA, 2012) e Grupo C (n = 8), composto por animais que receberam aplicações de solução de NaCl 0,9%, de maneira similar as tratadas. Os animais foram mantidos em canis coletivos, com acesso a água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios do Colégio Brasileiros de Experimentação Animal (COBEA). No final do experimento todos os animais foram doados.

3.4.2 Coleta e processamento das amostras

Foram coletadas por ovariectomia (OSH) amostras de ambos os cornos uterinos de todas as cadelas, após 6 meses do início do experimento. Para a OSH, as cadelas foram submetidas a jejum sólido de 12 horas e hídrico de 6 horas. O protocolo anestésico utilizado foi de 0,1 mg / kg / IM de acepromazina (Acepran 0,2%; Vetnil, Louveira, SP, Brasil), 5,0 mg / kg / IV de propofol (Propovan; Cristália, São Paulo, SP, Brasil). Após a indução os animais foram mantidos com anestesia inalatória com o uso do isoflurano (Forane, Baxter, USA).

Fragmentos de 0,5 cm do terço médio dos cornos uterinos foram fixados em paraformaldeído tamponado a 10% e processados histologicamente até inclusão em parafina (LUNA, 1968).

Os blocos de parafina contendo os fragmentos foram cortados em micrótomo (EDGE SL-200) para obtenção de cortes histológicos de 3 µm de espessura. Estes foram colocados em lâminas histológicas e corados utilizando-se diferentes corantes.

3.4.3 – *Análise histoquímica e histológica em microscopia de luz*

A descrição histoquímica foi realizada utilizando-se os testes *Periodic Acid Schiff* (PAS) (TOLOSA et al., 2003), para caracterização do órgão e das glândulas quanto à secreção de polissacarídeos (mucinas) neutros, e *Alcian Blue* (AB) pH 2,5 (BANCROFT e COOK, 1994), para verificar a presença de polissacarídeos (mucinas) ácidos.

Para a avaliação histológica da parede do útero utilizaram-se as colorações de Tricrômico de Masson (LUNA, 1968) para evidenciação de fibras colágenas e musculares, e Azul de Toluidina (TOLOSA et al., 2003) para identificação de células metacromáticas (mastócitos).

3.4.3.1 *Periodic Acid Schiff (PAS)*

As lâminas histológicas foram incubadas em ácido periódico 0,5% durante 25 minutos e lavadas em água destilada. Em seguida, as mesmas permaneceram em cubeta coberta com papel alumínio, à temperatura ambiente, imersas no reativo de Schiff por 15 minutos, sendo posteriormente lavadas em água corrente, por 5 minutos, e em água destilada por 1 minuto. Para a contra-coloração, utilizou-se hematoxilina por 30 segundos, seguida por uma rápida lavagem em água corrente (TOLOSA et al., 2003).

3.4.3.2 Alcian Blue pH 2,5

As lâminas foram primeiramente lavadas em solução de ácido acético glacial 3% por 5 minutos e incubadas em solução de *Alcian Blue* 1%, pH 2,5 em solução de ácido acético glacial 3% durante 40 minutos a 40°C. O material foi lavado na mesma solução tampão, seguida de uma lavagem em água destilada. Para contra coloração utilizou-se a solução de *fast red* 0,5% por 2 minutos e, posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada (BANCROFT; COOK, 1994).

3.4.3.3 Tricrômico de Masson

As lâminas ficaram submersas em solução de Bouin em estufa a 60°C por uma hora, que se seguiu de resfriamento até a temperatura ambiente. Depois deste procedimento, foram lavadas em água corrente por 15 minutos e rapidamente em água destilada. Após esta etapa, as lâminas foram posicionadas em suporte de coloração e os corantes aplicados sobre as mesmas na seguinte ordem: hematoxilina férrica por 5 minutos, lavagem em água corrente por 5 minutos e depois em água destilada; fucsina ácida adicionada de *ponceau* por 10 minutos, lavagem em água corrente por 1 minuto e depois em água destilada; ácido fosfomolibdico a 5% por 5 minutos até o clareamento dos cortes, lavagem em água corrente e água destilada rapidamente; azul de anilina a 0,5% por 5 minutos, lavagem em água corrente e água destilada rapidamente; ácido acético por 1 minuto (LUNA, 1968).

3.4.3.4 Azul de Toluidina

As lâminas histológicas permaneceram 2 minutos em Azul de Toluidina 1% e foram lavadas em água corrente (TOLOSA et al., 2003).

Para as técnicas histoquímicas de PAS e AB pH 2,5, três cortes histológicos do corno uterino foram selecionados e submetidos a avaliação, em microscopia de luz, identificando-se a presença ou ausência de marcação das substâncias químicas determinadas por cada técnica, em microscópio óptico (Olympus BX 50) nas objetivas de 20x e 40x. Quando da presença de marcação, a análise da secreção foi avaliada segundo a seguinte classificação: *grau 1* - ausência de marcação das células secretoras; *grau 2* - marcação discreta das células secretoras, ou em quantidades mínimas no lúmen; *grau 3* - marcação moderada das células secretórias, ou em quantidades moderadas no lúmen; *grau 4* - marcação intensa das células secretórias, ou em quantidades intensas no lúmen.

A avaliação histológica com Tricrômico de Masson foi realizada em microscopia de luz, identificando-se a presença ou ausência de marcação. A presença de mastócitos no útero foi identificada pela coloração metacromática característica dos grânulos secretórios corados pelo Azul de Toluidina. Os compartimentos teciduais usados para avaliar a distribuição dos mastócitos foram endométrio e miométrio. Para determinar a distribuição numérica de mastócitos/mm², foram avaliados 5 campos por amostra histológica.

3.4.4 Análise Estatística

Para a análise da intensidade de secreção pelas diferentes colorações, aplicou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras independentes (TRIOLA, 2013). A análise dos dados foi realizada no programa computacional de acesso livre R (R Development Core Team, 2011). As análises foram consideradas significativas quando o valor de p foi $\leq 0,05$.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas marcações para a coloração de Tricrômico de Masson na região periglandular, em ambos os grupos, o que demonstrou que o

tratamento crônico com MPA utilizado não causou fibrose periglandular no útero nas cadelas (Figura 1).

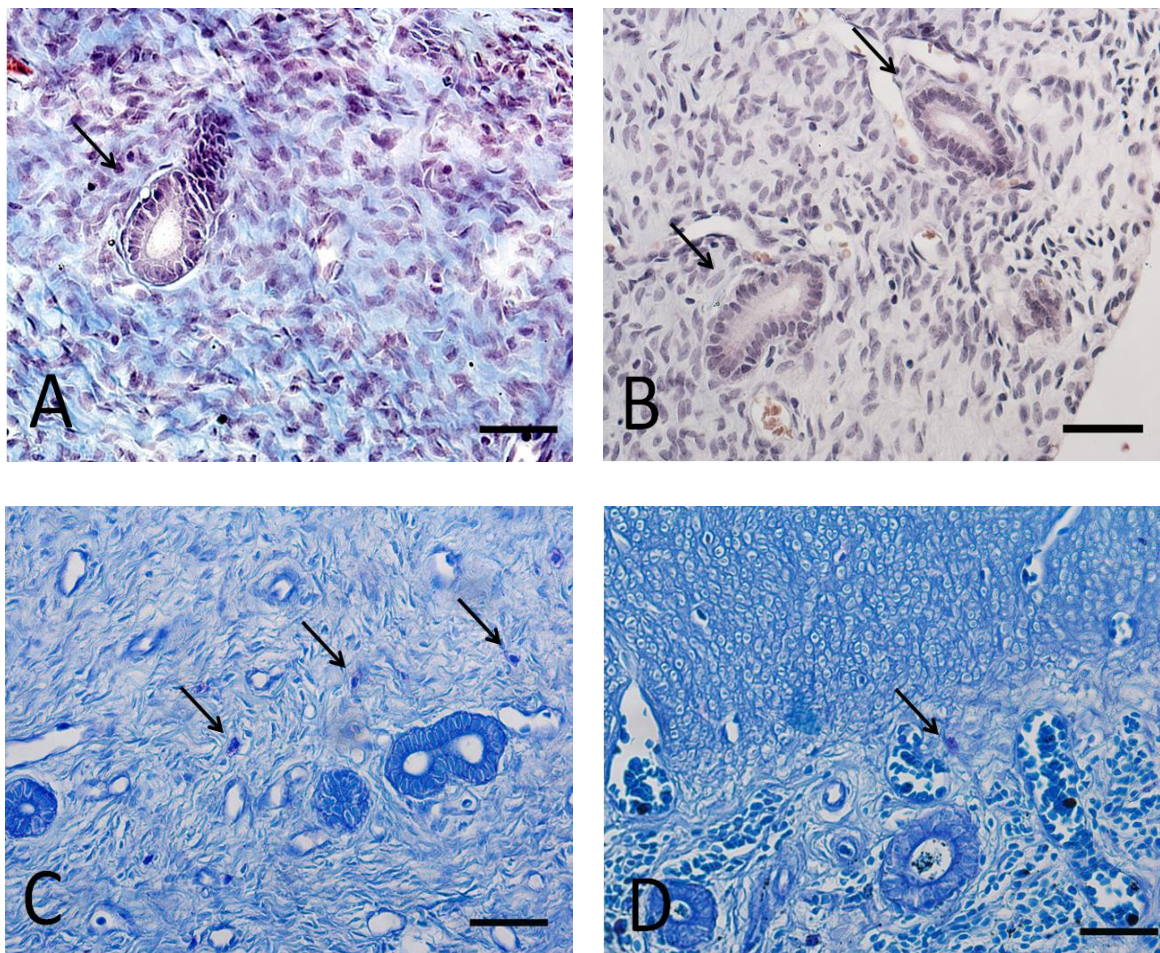


Figura 1. Fotomicrografias de cortes transversais do útero de cadelas pré-puberes tratadas com acetato de medroxiprogesterona, do nascimento aos 6 meses de idade, submetidos ao método de Tricrômico de Masson (A = grupo C, B = grupo MPA. As setas indicam as glândulas endometriais) e ao método de Azul de Toluidina (C = grupo MPA, D = grupo C. As setas indicam os mastócitos). Barra de escala = 20μm.

A fibrose é um dos principais elementos da reação tecidual, sendo, portanto, importante a determinação de seu arranjo, localização e composição para se avaliar o grau de comprometimento do endométrio. Nestas lesões, a deposição de colágenos ocorre mais comumente ao redor das glândulas, ou associada a membrana basal (KENNEY; DOIG, 1986). Essa alteração compromete a integridade e a função das glândulas endometriais, estruturas necessárias desde o período de pré-implantação embrionária até o

desenvolvimento placentário completo. Nas glândulas fibróticas, o epitélio se diferencia irregularmente, além de haver modificação das secreções glandulares (WALTER et al., 2001). Altas doses de acetato de medroxiprogesterona ou de progesterona, ou a exposição repetida ou prolongada em cadelas adultas levam a quadros de hiperplasia cística endometrial, com proliferação das glândulas endometriais e dilatação cística das mesmas, com acúmulo de fluido no lúmen uterino (Sokolowski e Zimbelman, 1974), sendo a fibrose um achado frequente (Dow, 1959). Assim, a ausência de fibrose periglandular observada no presente estudo indica que o tratamento crônico com MPA em cadelas pré-púberes possivelmente não comprometeria a fertilidade destes animais, na fase adulta, no que diz respeito a presença ou não de fibrose. De acordo com Van Cruchten et al. (2004), os padrões de proliferação endometrial em cadelas cíclicas e sua relação com as concentrações dos receptores de esteróides permanece desconhecida. Possivelmente em cadelas pré-púberes esta relação também não seja conhecida, embora haja expressão de receptores para progesterona e estradiol no útero de cadelas pré-púberes (COOKE et al., 2012).

Nenhuma cadela, em ambos os grupos, apresentou hiperplasia cística endometrial (HCE) e presença de conteúdo no interior do lúmen uterino, apesar do tratamento crônico com MPA, com duração de 6 meses. Este resultado difere dos achados de Dhaliwal et al. (1999), e de Kooistra et al. (1997), que verificaram a ocorrência de HCE em cadelas adultas, tratadas por 5 ou 13 semanas, com o mesmo protocolo do presente estudo. Em cadelas adultas, cíclicas, HCE é um achado anormal, porém frequente no útero, sendo mais frequente nas fêmeas idosas, cujo útero foi exposto a estímulos repetidos e crônicos da progesterona pela ocorrência de diversos ciclos estrais (DE BOSSCHERE et al., 2001). A ausência de HCE nas cadelas deste estudo provavelmente se deve a imaturidade do sistema reprodutor das cadelas, as quais estavam em fase de crescimento e desenvolvimento do sistema reprodutor, não apresentando glândulas endometriais totalmente desenvolvidas e responsivas a progestágenos, apesar da expressão de receptores para progesterona no útero de cadelas pré-púberes (COOKE et al., 2012).

Foi observada maior quantidade de mastócitos presentes no útero na região do miométrio em relação ao endométrio, em ambos os grupos.

Entretanto, houve diferença entre grupos em relação a quantidade de mastócitos no miométrio, mas não no endométrio. Além disso, o número de mastócitos no útero foi maior nos animais do grupo MPA do que no C (Tabela 1) (Figura 1). Os mastócitos encontrados no endométrio foram observados no estroma adjacente as glândulas endometriais, mas eles eram ausentes no epitélio. Já no miométrio estes foram encontrados no interior, entre os feixes musculares e em torno dos vasos sanguíneos.

Tabela 1. Distribuição de mastócitos/mm² no miométrio e endométrio de cadelas pré-púberes, tratadas com acetato de medroxiprogesterona do nascimento aos seis meses de idade, pela coloração de Azul de Toluidina.

Grupo	Miométrio	Endométrio	Útero
MPA	2,5 Aa	0,2 Bb	3,2 A
C	1,4 Ba	0,0 Bb	1,6 B

Medianas seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$). Medianas seguidas por letras minúsculas distintas na linha diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$).

Outros pesquisadores também relataram a presença de mastócitos no útero de mamíferos (JONES; DUVALL; GUILLETTE, 1980; BRANDON; EVANS, 1983, DRUDY; SHEPPARD; BONNAR, 1990, 1991). Similarmente ao encontrado no presente estudo, foi observada menor quantidade de mastócitos no endométrio quando comparado ao miométrio em ratas e cabras (KARACA; YORUK; USLU, 2007, KARACA et al., 2009). Da mesma forma, Milne et al. (2001) demonstraram que o miométrio humano tratado com progestágeno contém um maior número de mastócitos quando comparado com o endométrio, mas os autores não observaram diferença significativa na quantidade de mastócitos 24 ou 48 horas após a retirada do progestágeno.

Estudo recente demonstrou que a presença de mastócitos no útero de cadelas está significativamente relacionada com a concentração plasmática de progesterona e com as diferentes fases do ciclo estral (GOERICHKE-PESCH et al., 2010). Além disso, alguns pesquisadores também observaram um aumento no número de mastócitos durante a fase gestacional do ciclo e um declínio devido à ação dos estrógenos (MARASPIN; BO, 1971). De fato, dentre as

funções conhecidas para os mastócitos presentes no útero, tem-se a alta liberação de histamina durante o período de implantação embrionária (BATTH; PARSHAD, 2000). Isso ocorre num período do ciclo reprodutivo em que as concentrações plasmáticas de progesterona são altas, o que justifica a grande quantidade de mastócitos observada nas cadelas do presente estudo, que embora fossem fêmeas pré-púberes, tinham seu útero impregnado por MPA, o qual possui meia-vida longa, de 24 horas, e potente atividade progestacional (WILLIAMS; STANSEL, 1996; ROMAGNOLI; SONTAS, 2010).

Em ambos os grupos, foram encontradas apenas marcações graus 1 (ausente) e 2 (discreta) para PAS, e não houve diferença na intensidade de secreção uterina entre grupos com relação aos graus encontrados (Figura 2). Entretanto, o grupo MPA apresentou maior intensidade de secreção uterina (grau 2) em relação ao grupo C ($p \leq 0,05$). Com relação ao AB pH 2,5, em ambos os grupos também foram encontradas apenas marcações de graus 1 (ausente) e 2 (discreta), sem diferença entre grupos com relação a intensidade de secreção uterina ($p \leq 0,05$) (Tabela 2) (Figura 2).

Tabela 2. Medianas das intensidades (graus 1 e 2) de marcação no útero de cadelas pré-púberes, tratadas com acetato de medroxiprogesterona do nascimento aos seis meses de idade, pelas colorações de PAS e AB pH 2,5.

Grupo	Coloração	PAS		AB pH 2,5	
		Grau 1	Grau 2	Grau 1	Grau 2
MPA		0,0Aa	2,0Ab	0,5Aa	1,0Aa
C		0,5Aa	1,0Aa	0,0Aa	2,0Aa

Medianas seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$). Medianas seguidas por letras minúsculas distintas na linha diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$).

Fisiologicamente, o endométrio sob o estímulo da progesterona se hipertrofia devido a aumento no número e no tamanho de suas glândulas, que aumentam suas atividades secretoras, e um fluido estéril pode se acumular no lúmen do útero. Essas respostas às ações hormonais podem ser mais exacerbadas com o uso de progestágeno exógeno (DE BOSSCHERE et al.,

2001; DE BOSSCHERE et al., 2002; RAGNI, 2005 ; PRETZER, 2008), como o acetato de medroxiprogesterona, um progestágeno cujas ações são similares as da progesterona. Nas cadelas do grupo MPA, após 24 semanas de tratamento, a maior intensidade de secreção uterina (grau 2) pelo PAS em relação ao grupo C ($p < 0,05$), provavelmente deveu-se a responsividade dos receptores de progesterona presentes nas glândulas endometriais (COOKE et al., 2012), que mesmo após prolongado tratamento com MPA, “escaparam” da *down-regulation* causada pelo excesso de hormônio circulante, como descrito por De Bosschere et al. (2002) para cadelas adultas. Por outro lado, a ausência de intensidades de secreção uterina graus 3 e 4 pode ser justificada caso as cadelas tenham sofrido a *down-regulation*, impedindo a maior secreção glandular, ou pela idade dos animais, pré-púberes, e em pleno desenvolvimento corporal. Cadelas de ambos os grupos foram igualmente marcadas pelo AB pH 2,5.

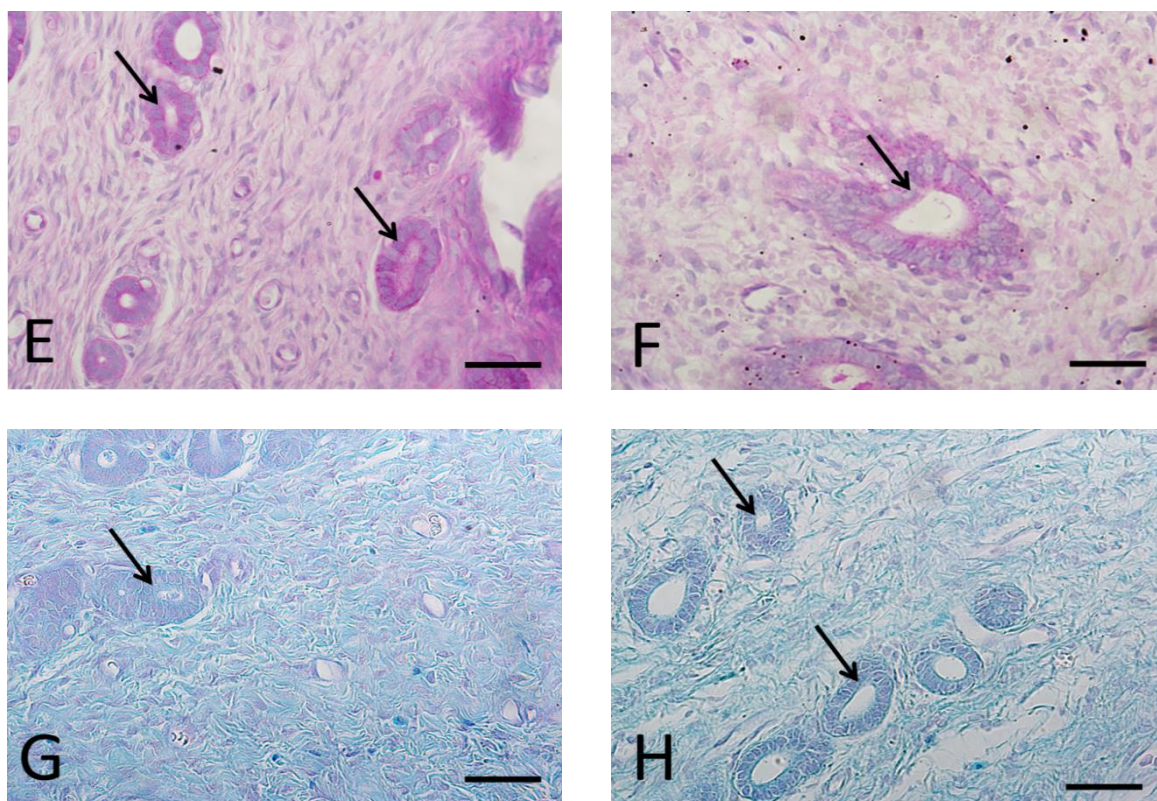


Figura 2. Fotomicrografias de cortes transversais do útero de cadelas pré-púberes tratadas com acetato de medroxiprogesterona, do nascimento aos 6 meses de idade, submetidos ao método de PAS (E = grupo MPA, F = grupo C) e ao método de AB pH 2,5 (G = grupo MPA, H = grupo C. As setas indicam a intensidade de secreção nas glândulas endometriais). Barra de escala = 20µm

3.6 CONCLUSÃO

Conclui-se que cadelas pré-púberes com ablação parcial da adenogênese uterina apresentam mínima atividade secretória uterina, ausência de fibrose periglandular e maior presença de mastócitos no miométrio em relação ao endométrio.

3.7 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro concedido aos alunos (CAPES), e à empresa Rações DuMilho (Bomguy ®) pelo fornecimento de alimento aos animais envolvidos no experimento.

3.8 REFERÊNCIAS

BANCROFT, J. D.; COOK, H. C. **Manual of Histological Techniques and their Diagnostic Application**. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1994.

BARTOL, F. F.; JOHNSON, L. L.; FLOYD, J. G.; WILEY, A. A.; SPENCER, T. E.; BUXTON, D. F.; COLEMAN, D. A. Neonatal exposure to progesterone and estradiol alters uterine morphology and luminal protein content in adult beef heifers. **Theriogenology**, v. 43, p. 835-844, 1995.

BARTOL, F. F.; WILEY, A. A.; SPENCER, T. E.; ING, N. H.; OTT, T. L.; BAZER, F. W. Progestin exposure from birth: epigenetic induction of a unique adult uterine phenotype in sheep—a glandless endometrium. **Biology of Reproduction**, v.56, p. 133, 1997.

BATTH, B. K.; PARSHAD, R. K. Mast cell dynamics in the house rat (*Rattus rattus*) ovary during estrus cycle, pregnancy and lactation. **European Journal of Morphology**, v. 38, p. 17–23, 2000.

BRANDON, J. M.; EVANS, J. E. Changes in uterine mast cells during the estrous cycle in the Syrian hamster. **American Journal of Anatomy**, v. 167, p. 241-247, 1983.

COOKE, P. S.; BORSDORF, D. C.; EKMAN, G. C.; DOTY, K. F.; CLARK, S. G.; DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; TSHAMALA, M.; CORYN, M. Changes in sex hormone receptors during administration of progesterone to prevent estrus in the bitch. **Theriogenology**, v. 6, p. 1209-17, 2002.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; VAN DEN BROECK, W. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected. **Theriogenology**, v. 55, p. 1509-1519, 2001.

DHALIWAL, G. K.; ENGLAND, G. C. W.; NOAKES, D. E. Oestrogen and progesterone receptors in the uterine wall of bitches with cystic endometrial hyperplasia/pyometra. **Veterinary Record**, v.145, p. 455-7, 1999.

DOW C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of Comparative Pathology**, v. 69, p. 237-50, 1959.

DRUDY, L.; SHEPPA, B. L.; BONNAR, J. Mast cells in the normal uterus and dysfunctional uterine bleeding. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 39,p. 193-201, 1990.

DRUDY, L.; SHEPPA, B. L.; BONNAR, J. The mast cells and histamine concentration of the post-menopausal uterus. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 42, p. 39-42, 1991.

DZIUK, P. J.; BARTOL, F. F. Uterine gland development begins postnatally and is accompanied by estrogen and progesterone receptor expression in the dog. GOERICKE-PESCH, S.; SCHMIDT, B.; FAILING, K.; WEHREND, A. Changes in the histomorphology of the canine cervix through the oestrous cycle. **Theriogenology**, v. 74, p.1075–1081, 2010.

GRAY, C. A.; JOHNSON, G. A.; BARTOL, F. F.; TARLETON, B. J.; WILEY, A. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Developmental biology of uterine glands. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1311–1323, 2001.

HAFEZ, E. S. E. **The cervix and sperm transport**. In: Human Reproduction: Conception and Contraception. Eds: Harper and Row, Hagerstown, p. 221-252, 1980.

JONES, R.E.; DUVALL, D.; GUILLETTE, L. J. Rat ovarian mast cells; distribution and cyclic changes. **Anatomical Record**, v. 197, p. 489-493, 1980.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: **Histologia Básica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 367-388, 1995.

KARACA, T.; YORUK, M.; USLU, S. Distribution and quantitative patterns of mast cells in ovary and uterus of rat. **Archivos de Medicina Veterinaria**, n. 2, p. 39, 2007.

KARACA, T.; YORUK, M.; USLU, S.; CETIN, Y.; USLU B. A. Distribution of eosinophil granulocytes and mast cells in the reproductive tract of female goats in the preimplantation phase. **Veterinary Research**, v. 33, p. 545–554, 2009.

KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders, p.723-729 1986.

KOOISTRA, H. S.; OKKENS, A. C.; MOL, J. A.; VAN GARDEREN, E.; KIPENSTEIJN, J.; RIJNBEEK, A. Lack of association of progestin-induced cystic endometrial hyperplasia with GH gene expression in the canine uterus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 355-361, 1997.

LUNA, L. G. **Manual of Histologic Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: McGraw Hill, p. 258, 1968.

MARASPIN, L. E.; BO, W. J. Effects of hormones, pregnancy and pseudopregnancy on the mast cell count in the rat uterus. **Life Sciences**, v. 10, 111-120, 1971.

MILNE, S. A.; RAKHYOOT, A.; DRUDY T. A.; BRECHIN, S.; RILEY, S. C.; CRITCHLEY, H. O. Co-localization of matrix metalloproteinase-1 and mast cell tryptase in the human uterus. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, p. 559-565, 2001.

PLUTA, K.; IRWIN, J. A.; DOLPHIN, C.; RICHARDSON, L.; FITZPATRICK, E.; GALLAGHER, M. E.; REID, C. J.; CROWE, M. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; CARRINGTON, S. D.; EVANS, A. C. O. Glycoproteins and glycosidases of the cervix during the periestrous period in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 4032-4042, 2011.

PRETZER, S. D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. **Theriogenology**, v. 70, p. 359-363, 2008.

RAGNI, R. A. Pyometra in a bitch following unusual sterilisation. **Small Animal Practice**, v. 46, p. 39-40, 2005.

RAMOS, J. L. G. **Desenvolvimento uterino em cadelas do nascimento aos seis meses de idade: análise histomorfométrica**. Alegre, ES, 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo.

ROMAGNOLI, S.; SONTAS, H. Manual of canine and feline reproduction and neonatology. In: England, G.; Heimendani, A. V. **British small animal veterinary**, 2 ed, cap. 3, p. 23-6, 2010.

TEIXEIRA, N. S. **Ablação parcial do desenvolvimento das glândulas endometriais em cadelas após exposição a progestágeno no período neonatal**. Alegre, ES, 2012. 38 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2.ed. Barueri: Manole, p. 331, 2003.

TRIOLA, M. F. **Introdução à Estatística: atualização da tecnologia**. 11ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, p. 707, 2013.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W.; D'HAESELEER, M.; SIMOENS, P. Proliferation patterns in the canine endometrium during the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 62, p. 631-641, 2004.

WALTER, I.; KLEIN, M.; HANDLER, J.; AURICH, J; REIFINGER, M.; AURICH, C. Lectin binding patterns of uterine glands in mares with chronic endometrial degeneration. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p.840-845, 2001.

WOLF, D. P.; BLASCO, L.; KHAN, M. A.; LITT, M. Human cervical mucus. IV. Viscoelasticity and sperm penetrability during the ovulatory menstrual cycle. **Fertility and Sterility**, v. 30, 163-169, 1978.

WILLIAMS, C. L.; STANSEL, G. M. Estrogens and progestins. In: GOODMAN, A. G.; MDINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. McGraw Hill, London, 1996.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste trabalho, constatou-se que cadelas pré-púberes submetidas a aplicações seriadas de acetato de medroxiprogesterona, e apresentando ablação parcial da adenogênese das glândulas endometriais, apresentam mínima atividade secretória uterina, e ausência de fibrose periglandular. Não foi possível determinar se esta mínima atividade secretória se deveu ao fato de as cadelas serem pré-púberes, ou seja, com o sistema reprodutor imaturo, ou se sofreram inibição de sua atividade secretória pelo tratamento crônico com o progestágeno utilizado.

Estudos *in vivo*, avaliando a fertilidade das cadelas tratadas com MPA por meio de acasalamentos com machos de fertilidade conhecida, poderiam esclarecer se a fertilidade destas fêmeas cadelas com ablação parcial da adenogênese uterina foi afetada ou não.

5. REFERÊNCIAS

- ALTMAN, J. Gonadal hormones humour the brain. **Neuroendocrinology**, v. 79, p. 287- 95, 2004.
- ANDRIANIFAHANANA, M.; MONIAUX, N.; BATRA, S. K. Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1765, p. 189-222, 2006.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2ª ed. São Paulo: Manole, p. 629, 1992.
- BARRAU, M. D.; ABEL JR J. H.; VERHAGE, H. G.; TIETZ JR, W. J. Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch. **American Journal of Anatomy**, v. 142, p. 47–65, 1975.
- BARTOL, F. F.; JOHNSON, L. L.; FLOYD, J. G.; WILEY, A. A.; SPENCER, T. E.; BUXTON, D. F.; COLEMAN, D. A. Neonatal exposure to progesterone and estradiol alters uterine morphology and luminal protein content in adult beef heifers. **Theriogenology**, v. 43, p. 835-844, 1995.
- BARTOL, F. F.; WILEY, A. A.; SPENCER, T. E.; ING, N. H.; OTT, T. L.; BAZER, F. W. Progestin exposure from birth: epigenetic induction of a unique adult uterine phenotype in sheep—a glandless endometrium. **Biology of Reproduction**, v.56, p. 133, 1997.
- BARTOL, F. F.; WILEY, A. A.; SPENCER, T. E.; VALLET, J. L.; CHRISTENSON, R. K. Early uterine development in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 48, p. 99–116, 1993.
- BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M.; THATCHER, W. W. Actions of hormones on the uterus and effect of conceptus development. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 35–45, 1979.
- BECHER, N.; HEIN, M.; DANIELSEN, C. C.; ULDBJERG, N. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the cervical mucus plug at term of pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.191, p. 1232-1239, 2004.
- BEIJERINK, N. J.; BHATTI, S. F. M.; OKKENS, A. C.; DIELEMAN, S. J.; MOL, J. A.; DUCHATEAU, L.; VAN HAM, L. M. L.; KOOISTRA, H. S. Adenohypophyseal function in bitches treated with medroxyprogesterone acetate. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 32, p. 63–78, 2007.
- BROCKE, C.; KUNZ, H. Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 3085-3112, 2002.
- BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C. C.; DI NOIS, J. M. Trypanossoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 229-236, 2006.

CARLSTEDT, I.; SHEEHAN, J. K.; CORFIELD, A. P.; GALLAGHER, J. T. Mucous glycoproteins: a gel of a problem. **Essays in Biochemistry**, v. 20, p. 40-76, 1985.

CHANDRA, S. A.; ADLER, R. R. Frequency of different estrous stages in purpose-bred beagles: a retrospective study. **Toxicologic Pathology**, v. 36, p. 944-949, 2008.

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

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

COOKE, P. S.; BORSDORF, D. C.; EKMAN, G. C.; DOTY, K. F.; CLARK, S. G.; DZIUK, P. J.; BARTOL, F. F. Uterine gland development begins postnatally and is accompanied by estrogen and progesterone receptor expression in the dog. **Theriogenology**, v.78, p. 1787–1795, 2012.

CUNLIFFE, R. N.; MAHIDA, Y. R. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, p. 49-58, 2004.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; VAN DEN BROECK, W. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected. **Theriogenology**, v. 55, p. 1509-1519, 2001.

DEKKER, J.; ROSSEN, J. W.; BULLER, H. A.; EINERHAND, A. W. The MUC family: an obituary. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, p. 126-31, 2002.

DOW C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of Comparative Pathology**, v. 69, p. 237-50, 1959.

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. Periparturient diseases. In: **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia: W. B. Saunders, cap.19, p. 586, 1996.

FOSSUM, T. W. Cirurgias do sistema reprodutivo e genital. In Elsevier: **Cirurgia de pequenos animais**, ed. 3, p. 302-374, 2008.

GEIGER, J.; REDDY, B. G.; WINTERFELD, G. A.; WEBER, R.; PRZYBYLSKI, M.; SCHIMIDT, R. R. Glycal Glycosylation ans 2-nitroglycal concatenation, a

powerful combination for mucin core structure synthesis. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, p. 4367-4377, 2007.

GOLD, D. V.; SHOCHAT, D.; MILLER, F. Protease digestion of colonic mucin. Evidence for the existence of two immunochemically distinct mucins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 25, p. 6354-8, 1981.

GRAY, C. A.; JOHNSON, G. A.; BARTOL, F. F.; TARLETON, B. J.; WILEY, A. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Developmental biology of uterine glands. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1311–1323, 2001.

GRAY, C. A.; TAYLOR, K. M.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Mechanisms regulating norgestomet inhibition of endometrial gland morphogenesis in the neonatal ovine uterus. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, p. 7–78, 2000.

HAFEZ, E. S. E. **Anatomy of female reproduction**. In: Reproduction in farm animals. 6.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, cap. 2, p. 20-55, 1993.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6 ed. São Paulo: Manole, p. 582, 1995.

HAFEZ, E. S. E.: **The cervix and sperm transport**. In: Human Reproduction: Conception and Contraception. Eds: Harper and Row, Hagerstown, p. 221-252, 1980.

HAYNES, R. J.; TIGHE, P. J.; DUA, H. S. Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, p. 737-741, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Feminino. In: **Histologia Básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 367-88, 1999.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: **Histologia Básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 443-444, 2004.

KUTZLER, M.; WOOD, A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**, v. 66, p. 514-525, 2006.

LEPPI, T. J.; SPICER, S. S. The histochemistry of mucins in certain primate salivary glands. **American Journal of Anatomy**. v. 118, p. 833-59, 1966.

MAXIMOW, A. A.; BLOOM, W. **Female genital system**. In: A textbook of histology. 7.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 505-544, 1957.

MILNE, S. A.; RAKHYOOT, A.; DRUDY T. A.; BRECHIN, S.; RILEY, S. C.; CRITCHLEY, H. O. Co-localization of matrix metalloproteinase-1 and mast cell tryptase in the human uterus. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, p. 559-565, 2001.

MUNSON, L. Contraception in felids. **Theriogenology**, v. 66, p. 126–134, 2006.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologias do Útero**. In: Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 49-69, 2003.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. 2.ed. Guanabara Koogan, p. 156, 2003.

OEHLER, M. K.; REES, M. C. P.; BICKNELL, R. Steroids and the Endometrium. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 543-560, 2000.

PLUTA, K.; IRWIN, J. A.; DOLPHIN, C.; RICHARDSON, L.; FITZPATRICK, E.; GALLAGHER, M. E.; REID, C. J.; CROWE, M. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; CARRINGTON, S. D.; EVANS, A. C. O. Glycoproteins and glycosidases of the cervix during the periostrous period in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 4032–4042, 2011.

PRETZER, S. D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. **Theriogenology**, v. 70, p. 359-363, 2008.

PRIEDKALNS, J. S. Sistema reprodutor feminino. In: DELLMAN, H.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 255-277, 1982.

RAGNI, R. A. Pyometra in a bitch following unusual sterilisation. **Small Animal Practice**, v. 46, p. 39-40, 2005.

RAMOS, J. L. G. **Desenvolvimento uterino em cadelas do nascimento aos seis meses de idade: análise histomorfométrica**. Alegre, ES, 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo.

REHM, S.; STANISLAUS, D. J.; WILLIAMS, A. M. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. **Birth Defects Research**, v. 80, p. 233-245, 2007.

ROGAN, M. P.; GERAGHTY, P.; GREENE, C. M.; O'NEILL, S. J.; TAGGART, C. C.; MCELVANEY, N. G. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. **Respiratory Research**, v. 7, p. 29, 2006.

ROMAGNOLI, S.; CONCANNON, P. W. Clinical Use of Progestins in bitches and queens: a review. In: CONCANNON, P. W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. (Eds). **Recent Advances in Small Animal Reproduction**. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2003.

ROMAGNOLI, S.; SONTAS, H. Manual of canine and feline reproduction and neonatology. In: England, G.; Heimendani, A. V. **British small animal veterinary**, 2 ed, cap. 3, p. 23-6, 2010.

SAMUEL, C. A.; ALLEN, W. R.; STEVEN, D. H. Studies on the equine placenta III. Ultrastructure of the uterine glands and the overlying trophoblast. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 433–437, 1977.

SPENCER, T. E.; HAYASHI, K.; HU, J.; CARPENTER, K. D. Comparative development biology of the mammalian uterus. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 68, p. 85-122, 2005.

SPENCER, T.; BAZER, F. W. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. E4-E13, 2004.

SPICER, S. S.; LEPPI, T. J.; STOWARD, P. J. Suggestions for a histochemical terminology of carbohydrate-rich tissue components. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 13, p. 599-603, 1965.

SOKOLOWSKI, J. H.; ZIMBELMAN, R. G. Canine reproduction: effects of multiple treatments of medroxyprogesterone acetate on reproductive organs of the bitch. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 1285-7, 1974.

SUGIURA, K.; NISHIKAWA, M.; ISHIGURO, K.; TAJIMA, T.; INABA, M.; TORII, R. Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. **Immunobiology**, v. 209, p. 619-627, 2004.

TEIXEIRA, N. S. **Ablação parcial do desenvolvimento das glândulas endometriais em cadelas após exposição a progestágeno no período neonatal**. Alegre, ES, 2012. 38 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo.

VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; HELLEMANS, A.; CORYN, M.; LAUWERS, H. Immunohistochemical detection of progesterone receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 53, p. 773-788, 2000.

VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; LAUWERS, H.; CORYN, M. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 51, p. 729-743, 1999.

WILSHER, S.; LEFRANC, A. C.; ALLEN, W. R. Post natal oestrogen administration stimulates precocious endometrial gland development in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, p. 678-684, 2009.

WINTERFELD, G. A.; KHODAIR, A. I.; SCHMIDT, R. R. O-glycosyl amino acids by 2-nitrogalactal concatenation – synthesis of a mucin-type O-glycan. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 6, p. 1009-1021, 2003.

WOLF, D. P.; BLASCO, L.; KHAN, M. A.; LITT, M. Human cervical mucus. IV. Viscoelasticity and sperm penetrability during the ovulatory menstrual cycle. **Fertility and Sterility**, v. 30, 163-169, 1978.

WRESCHNER, D. H.; HAREUVENI M, TSARFATY I, SMORODINSKY N, HOREV J, ZARETSKY J, KOTKES P, WEISS M, LATHE R, DION A, et al. Human epithelial tumor antigen Cdna sequences. Differential splicing may generate multiple protein forms. **European Journal of Biochemistry**, v. 189, p. 463-73, 1990.

YIN, Y.; MA, L. Development of the mammalian female reproductive tract. **Journal of Biochemical**, v. 137, p. 677–683, 2005.