

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

JOSÉ LEONARDO GUALBERTO RAMOS

**DESENVOLVIMENTO UTERINO EM CADELAS DO
NASCIMENTO AOS SEIS MESES DE IDADE: ANÁLISE
HISTOMORFOMÉTRICA**

ALEGRE – ES

2012

JOSÉ LEONARDO GUALBERTO RAMOS

**DESENVOLVIMENTO UTERINO EM CADELAS DO
NASCIMENTO AOS SEIS MESES DE IDADE: ANÁLISE
HISTOMORFOMÉTRICA**

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

2012

JOSÉ LEONARDO GUALBERTO RAMOS

**DESENVOLVIMENTO UTERINO EM CADELAS DO
NASCIMENTO AOS SEIS MESES DE IDADE: ANÁLISE
HISTOMORFOMÉTRICA**

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 21 de agosto de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof^a. Dra. Louisiane de Carvalho Nunes
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dra. Isabel Candia Nunes da Cunha
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Dedico este trabalho aos meus Pais, irmãos
filho e esposa.

Vocês são a razão do meu viver.

.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo, ao Centro de Ciências Agrárias – Campus Alegre e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, por oferecerem condições para realização desta pesquisa;

A meu Orientador Dr. Marcelo Rezende Luz, pela orientação, compreensão e confiança;

À Professora Isabel Candia Nunes da Cunha e ao professor Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho pelos ensinamentos, incentivo, dedicação e ajuda no desenvolvimento do trabalho em parceria com a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF);

Aos técnicos, estagiários e alunos de graduação e Pós-graduação do LSA-UENF que me ajudaram incansavelmente a atingir meu objetivo;

Ao professor e amigo Eduardo Shimoda pela dedicação, ensinamento e amizade;

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Campos dos Goytacazes e Associação de Proteção Animal - APA, pela ajuda na obtenção de material;

Aos colegas da Pós-Graduação Natália Soares, Vagner Arêas, Carlos Renato Guaitolini, Bianca Martins, Lívia Ramos, Maria Aparecida da Silva, Cíntia Bernardo e Rafaele Motta por terem me proporcionado um agradável convívio me ajudando a tornar esta minha caminhada mais fácil;

A minha esposa Cristina Leite Francisco Gualberto Ramos que com muita paciência esteve o tempo todo ao meu lado contribuindo com seus serviços, conhecimentos e entendendo minha ausência;

A meu amado filho Gabriel Leite Francisco Gualberto Ramos que veio ao mundo para alegrar e dar um novo sentido em minha vida;

Ao meu pai José Eloi Ferreira Ramos, que me ensinou a dar valor a educação e ensino;

À minha mãe Rozenita Coutinho Gualberto Ramos pelo carinho, incentivo e amor que me conduz a ir mais longe o quanto possível;

As minhas irmãs, Tatiana Gualberto Ramos e Gizela Gualberto Ramos, por serem muito importantes na minha vida, e terem me servido de espelho cada uma, em um momento nesta caminhada;

Aos meus primos Felipe Gualberto Freitas, Rafael Gualberto Freitas e Gustavo Gualberto Freitas que sempre me ajudam no momento de dificuldade;

As minhas cunhadas Cristiane Leite Francisco Baptista, Idália Maria D'Araujo Crischigno e Adriana Crischigno pelo incentivo e amizade;

A meu Cunhado Joel Martins que mesmo de longe sempre transmitiu incentivo e força nesta caminhada;

Aos meus concunhados Leonardo Hauaji e Antônio Marcos Baptista pelo incentivo e amizade;

Aos tios Rozana de Fátima Coutinho Gualberto de Freitas e Nilo José de Freitas pelo incentivo, amizade, ajuda e ótimo convívio que sempre me fizeram feliz.

Ao companherismo de Ettore e Teresinha D' Araújo Crischigno pela credibilidade e incentivo;

Aos tios e tias pelos incentivos;

A todas as pessoas que, de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho;

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

Aos órgãos Coodenação de Aperfeiçoamente de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.

Obrigado a todos.

“Uma mágoa não é motivo para outra mágoa. Uma lágrima não é motivo para outra lágrima. Uma dor não é motivo para outra dor. Só o riso, o amor e o prazer merecem revanche. O resto, mais que perda de tempo... é perda de vida.”

Chico Xavier

BIOGRAFIA

JOSÉ LEONARDO GUALBERTO RAMOS, filho de José Eloi Ferreira Ramos e Rozenita Coutinho Gualberto Ramos, nascido em 11 de abril de 1979, na cidade de Campos dos Goytacazes - RJ.

Iniciou o Curso de Medicina Veterinária em março de 1998, graduando-se em dezembro de 2002 na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes-RJ.

De janeiro de 2003 a dezembro de 2009 trabalhou como médico veterinário em clínica veterinária, foi responsável técnico de estabelecimentos comerciais destinados ao mercado Pet e participou de projetos de extensão na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), no Núcleo de Apoio a Reprodução de Carnívoros (NuARC).

Foi admitido em março de 2010 no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado, na Universidade Federal do Espírito Santo – Campus Alegre, submetendo-se à defesa de dissertação para conclusão do curso em agosto de 2012.

RESUMO

O desenvolvimento de pesquisas que visam o melhor entendimento da formação e funcionamento do sistema reprodutor da fêmea e que propiciam conhecimentos para o desenvolvimento de métodos contraceptivos tem se tornado cada vez mais relevante. Além disso, não se tem descrição da caracterização do desenvolvimento uterino na cadela, como observado em outras espécies, principalmente em relação as glândulas endometriais. Assim, objetivou-se caracterizar o desenvolvimento uterino em cadelas do nascimento aos seis meses de idade. Foram avaliados úteros de 32 cadelas pré-púberes com um a 180 dias pós-nascimento (DPN), distribuídas em oito grupos com quatro animais cada, sendo: G1=1DPN, G2=15DPN, G3=30DPN, G4=45DPN, G5=60DPN, G6=90DPN, G7=120DPN e G8=180DPN. Foram avaliados o tipo de epitélio, presença e quantidade de glândulas endometriais, realizou-se mensuração da espessura da parede uterina total (μm), espessura do miométrio (μm), espessura do endométrio (μm), diâmetro (μm) e número ($\text{n}^\circ/\text{mm}^2$) de glândulas endometriais. A histoarquitetura do útero com 1 DPN revelou característica rudimentar com células cúbicas simples apoiadas em estroma em organização, lâmina própria desprovida de glândulas endometriais; miométrio rudimentar e presença de perimétrio; aos 15 DPN observou-se presença de estruturas glandulares rudimentares, com início das invaginações (pregueamento endometrial); dos 30 aos 45 dias observou-se discreta ramificação das glândulas que se tornaram mais evidentes; aos 60 DPN observaram-se glândulas endometriais em lâmina própria com ramificações e discreto pregueamento endometrial; de 90 a 180 DPN todas as estruturas uterinas apresentaram histoarquitetura de um animal maduro, com maior número de glândulas endometriais em lâmina própria. Todas as variáveis avaliadas apresentaram baixo coeficiente de variação (<10%) demonstrando uma homogeneidade nos dados avaliados, bem como correlações significativas ($P < 0,0001$) entre todas as variáveis analisadas com a idade animal [parede uterina total ($R^2=97,4\%$), endométrio total ($R^2=99,4\%$), miométrio total ($R^2=95,8\%$), número de glândulas endometriais ($R^2=92,3\%$); diâmetro das glândulas endometriais ($R^2=94,1\%$) e altura do epitélio ($R^2=72,2\%$). Conclui-se que o útero de cadelas é desprovido de glândulas endometriais ao nascimento; que ele se desenvolve continuamente do nascimento aos 180 dias; que as glândulas endometriais iniciam desenvolvimento contínuo a partir dos 15 dias; e que após 60

dias do nascimento a cadela apresenta conformação histológica uterina de um animal adulto.

Palavras-chave: glândulas endometriais, útero, desenvolvimento, histologia, cadela.

ABSTRACT

It has become increasingly relevant the development of research for a better understanding of the formation and functioning of the female reproductive system, providing knowledge for the development of contraceptive methods. However, there is no description of the characterization of uterine development in the dog, as observed in other species, particularly in relation to the endometrial glands. The objective was to characterize the uterine development in female dogs from birth to six months of age. We evaluated uteri of 32 prepubertal bitches, between one and 180 days postnatal (DPN), divided into eight groups of four animals each: G1 = 1DPN, G2 = 15DPN, G3 = 30DPN, 45DPN = G4, G5 = 60DPN, 90DPN = G6, G7 and G8 = 120DPN = 180DPN. We evaluated the type of epithelium, presence and amount of endometrial glands, performed measurement of the total thickness of the uterine wall (μm), myometrium thickness (μm), endometrial thickness (μm), diameter (mm) and the number (n/mm^2) of endometrial glands. At day 1 after birth, the histoarchitecture of uterus revealed rudimentary aspect with simple cubic cells in the stroma in organization, lamina propria devoid of endometrial glands, rudimentary endometrium and presence of serosa. At 15 DPN we observed presence of rudimentary glandular structures and beginning of invaginations (endometrial folding); from 30 to 45 days discrete glands branching was observed and became more evident; at 60 DPN we observed endometrial glands in lamina propria, with branching and discrete endometrial folding; from 90 to 180 DPN all uterine structures showed histoarchitecture of an adult animal, with a higher number of endometrial glands. All variables studied had low coefficient of variation ($<10\%$) showing homogeneity of data evaluated, as well as significant correlations ($P < 0.0001$) between all studied variables with animal's age [total uterine wall ($R^2 = 97.4\%$), total endometrium ($R^2 = 99.4\%$), total myometrium ($R^2 = 95.8\%$), number of endometrial glands ($R^2 = 92.3\%$); diameter of endometrial glands ($R^2 = 94.1\%$) and epithelial height ($R^2 = 72.2\%$). We conclude that the uterus of the bitch is devoid of endometrial glands at birth; it continuously evolves between birth and 180 days after birth; that the first endometrial glands are observed at 15 days after birth; and that after 60 days of age the bitch presents uterine histological conformation of an adult animal.

Keywords: endometrial glands, uterus, development, histology, bitch.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1 – Fotomicrografias do útero de cadelas do nascimento aos seis meses de idade. A) 1 DPN – Útero com ausência de glândulas endometriais; B) 15 DPN – Presença de glândulas endometriais rudimentares (setas); C) 30 DPN e 45 DPN – Glândulas endometriais simples, poucas ramificações (setas); D) 60 DPN – Glândulas endometriais simples (setas) e início de pregueamento do endométrio (cabeças de seta); E) 120 DPN e 180 DPN - Aumento do número de glândulas presentes em lâmina própria (setas) - Obj. 10x/HE. 39
- Figura 2 – Esquema proposto do desenvolvimento das glândulas endometriais (adenogênese) em cães comparativamente com outras espécies. PND = Dias pós nascimento. 66

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Dados histomorfométricos do útero de cadelas pré-púberes com idades entre um e 180 dias pós-nascimento (médias \pm EP; CV)	41
---	----

Anexo 1

Tabela 2 – Equações de regressão das avaliações histomorfométricas do útero de cadelas pré-púberes com idades entre um e 180 dias pós-nascimento, com respectivos coeficientes de determinação (R^2) e significância (P).	62
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Anexo 2

- Gráfico 1 – Diagrama de dispersão da espessura da parede uterina total pela idade das cadelas – representação da equação de regressão ajustada e do coeficiente de derterminação (R^2). 63
- Gráfico 2 – Diagrama de dispersão da espessura do miométrio pela idade das cadelas – representação da equação de regressão ajustada e do coeficiente de derterminação (R^2). 63
- Gráfico 3 – Diagrama de dispersão da espessura do endométrio pela idade das cadelas – representação da equação de regressão ajustada e do coeficiente de derterminação (R^2). 64
- Gráfico 4 – Diagrama de dispersão do número de glândulas endometriais/ mm^2 pela idade das cadelas – representação da equação de regressão ajustada e do coeficiente de derterminação (R^2). 64
- Gráfico 5 – Diagrama de dispersão do diâmetro das glândulas endometriais pela idade das cadelas – representação da equação de regressão ajustada e do coeficiente de derterminação (R^2). 65
- Gráfico 6 – Gráfico 6 – Diagrama de dispersão da altura do epitélio pela pela idade das cadelas – representação da equação de regressão ajustada e do coeficiente de derterminação (R^2). 65

LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

CL –	Corpo lúteo
CV –	Coeficiente de variação
EP –	Erro padrão
ER –	Receptor de estrógeno
FGF –	Fator de crescimento de fibroblastos
DPN –	Dia (s) pós-nascimento
EL -	Epitélio luminal
EG -	Epitélio glandular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 SISTEMA REPRODUTOR	19
2.1.1 Útero	20
2.1.2 Glândulas endometriais.....	22
2.1.3 Desenvolvimento das glândulas endometriais em diferentes espécies.....	24
2.1.3.1 Suínos	24
2.1.3.2 Roedores	24
2.1.3.3 Humanos	25
2.1.3.4 Ovinos e bovinos	25
2.1.3.5 Equinos.....	26
3. CAPÍTULO 1 - DESENVOLVIMENTO UTERINO EM CADELAS DO NASCIMENTO AOS SEIS MESES DE IDADE: ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	31
3.1 RESUMO	33
3.2 ABSTRACT	34
3.3 INTRODUÇÃO	35
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.5 RESULTADOS.....	38
3.6 DISCUSSÃO	42
3.7 CONCLUSÕES.....	45
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	51
5. REFERÊNCIAS.....	52
6. ANEXOS	62

1. INTRODUÇÃO

O útero é um órgão essencial para a reprodução em mamíferos e vários fatores complexos regulam o seu desenvolvimento no feto ou neonato (SPENCER et al., 2005). Assim, o conhecimento da diferenciação e histologia uterina pode ajudar a prevenir e tratar a infertilidade dos animais domésticos, além de proporcionar meios para o controle reprodutivo (BARTOL et al., 1999). De acordo com Spencer e Bazer (2004), as variações morfológicas que as estruturas dos órgãos reprodutivos sofrem no decorrer do seu desenvolvimento nos diferentes estágios fetais e pós-natal devem ser pesquisadas de forma mais abrangente por representar importante papel na reprodução.

Dentre as principais funções do útero para a reprodução, tem-se: transporte e capacitação dos espermatozoides até chegada ao oviduto para fertilização e armazenamento destes aderidos às criptas luminas das glândulas endometriais (BANKS, 1992, ENGLAND et al., 2006); controle da função do corpo lúteo de algumas espécies, como ruminantes, pela atividade da prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), produzida pelas células epiteliais endometriais; favorecimento para um ambiente adequado para o desenvolvimento inicial do embrião, reconhecimento materno da gestação (em algumas espécies) e sinalização para implantação e placentação para crescimento e desenvolvimento do feto durante a gestação (HAFEZ, 1995; CARSON et al., 2000; GONZÁLEZ, 2002); e contrações uterinas no momento do parto, favorecendo a expulsão fetal (CONCANNON et al., 1988; LUZ et al., 2006a).

Histologicamente o útero é formado por três camadas: endométrio ou mucosa, miométrio ou muscular e perimétrio ou serosa (NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

Estudos acerca das modificações histológicas que ocorrem durante a morfogênese dos órgãos reprodutores foram realizados em diversas espécies, como ovinos, suínos, roedores e humanos (VALDES-DAPENA, 1973; BRODY e CUNHA 1989; SPENCER et al., 1993; GRAY et al., 2000) e muitos são os estudos relacionados à histologia uterina de cadelas adultas (DOW, 1957; WEISS et al., 2004; CARREIRA e PIRES, 2005; MONTEIRO et al., 2009). Entretanto, estudos

sobre o desenvolvimento uterino e especificamente das glândulas endometriais em cadelas jovens (pré-púberes) são raros na literatura, tendo sido demonstrado que cadelas com idade superior aos três meses já apresentam histoarquitetura uterina formada e presença de glândulas endometriais em lâmina própria (MONTEIRO et al., 2009). Na literatura consultada não foram encontradas descrições da caracterização do desenvolvimento das glândulas uterinas em cadelas.

As glândulas endometriais são estruturas características no útero de todos os mamíferos (GRAY et al., 2000) e apresentam como função principal sintetizar e transportar secreções complexas de proteínas e substâncias histotróficas que inicialmente irão nutrir o blastocisto até a formação dos envoltórios diferenciados que proporcionam a definitiva implantação e placentação (GRUNERT e BIRGEL, 1989, DANTZER e LEISER, 1998), que na cadela ocorre entre 18 e 21 dias após as ovulações ou do 22º ao 23º dia a partir do pico de hormônio luteinizante (LH), segundo Reynaud et al. (2005).

O conhecimento do papel funcional das glândulas endometriais em algumas espécies proporcionou a execução de estudos como administração de progestágenos, como em ovelhas neonatais, nas quais houve total inibição do desenvolvimento das glândulas endometriais, e assim demonstrando a necessidade de um epitélio glandular normal para o desenvolvimento e crescimento do concepto (GRAY et al., 2000). Em bovinos, inibição parcial ou total das glândulas endometriais e baixa taxa de natalidade também foi alcançada com aplicações da associação de progesterona e estradiol desde o nascimento (BARTOL et al., 1999; BARTOL et al., 1993). Todavia, o conhecimento dos mecanismos de regulação básica do desenvolvimento uterino ainda não foi totalmente elucidado (GRAY et al., 2000).

Com base no conhecimento de que a diferenciação morfológica dos órgãos reprodutores das fêmeas de alguns mamíferos domésticos se completa após o nascimento (BARTOL et al., 1999; GRAY et al., 2001), objetivou-se com este estudo caracterizar o desenvolvimento uterino em cadelas do nascimento aos seis meses de idade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema reprodutor

O sistema reprodutor é composto por a) dois ovários, onde há secreção dos hormônios esteróides sexuais e gametogênese; b) dois ovidutos, responsáveis pelo transporte dos ovócitos e espermatozóides, local da fertilização e primeiras clivagens do embrião, apresentando ainda presença de fluidos que proporcionam o ambiente adequado para nutrição dos oócitos, espermatozóides e o embrião em desenvolvimento antes de atingir o útero; c) útero, o qual apresenta como funções mais importantes o transporte dos espermatozóides, implantação do embrião, placentação, desenvolvimento da gestação, e expulsão fetal no momento do parto; d) vagina, local onde o sêmen é depositado e armazenado após acasalamento ou inseminação artificial; serve ainda como um duto excretor das secreções cervicais e uterinas, além de ser a via de passagem fetal durante o parto (HAFEZ, 1995; YIN e MA 2005); e) vestíbulo vaginal, onde há abertura da uretra; f) vulva, a qual possui dois lábios, responsável por atuar como barreira anatômica de proteção do sistema reprodutor contra microrganismos; g) clitóris, órgão erétil constituído de tecido esponjoso, localizado no assoalho do vestíbulo e bem desenvolvido na cadela; h) glândulas mamárias, que apesar de se tratarem de glândulas da pele, estão intimamente associadas ao funcionamento dos órgãos reprodutivos da fêmea por terem função primordial na fase final do ciclo reprodutivo dos mamíferos com seu desenvolvimento funcional no período final da gestação e no puerpério, momento da lactação (ELLENPORT, 1986). Em todos os mamíferos, o desenvolvimento do útero acontece por uma especialização dos ductos paramesonéfricos ou de Müller, os quais também dão origem aos ovidutos e vagina (SPENCER e BAZER, 2004; YIN e MA, 2005).

2.1.1 Útero

O útero é o órgão do sistema reprodutor feminino que recebe o embrião, sendo o local de sua implantação, onde se estabelecem as relações vasculares do embrião/feto durante todo o período de gestação. É um órgão cavitário que apresenta parede relativamente espessa e grande capacidade de distender-se e de voltar ao tamanho normal. Morfologicamente, nas fêmeas domésticas, o útero é constituído por dois cornos, um corpo e um colo ou cérvix (HAFEZ, 1995; YIN e MA, 2005).

É constituído de três camadas, sendo uma camada mucosa também denominada endométrio; uma camada muscular ou miométrio; e de uma camada serosa ou perimétrio (NASCIMENTO e SANTOS, 2003). A parede uterina é dividida funcionalmente em endométrio e miométrio (SPENCER et al., 2000), e sofre uma seqüência definida de alterações durante o ciclo estral sobre influência dos hormônios esteróides sexuais, estrógenos e progesterona (PRIEDKALNS, 1982; OEHLER et al., 2000).

Eventos morfogenéticos comuns para o desenvolvimento do útero de mamíferos incluem 1) uma organização e estratificação do estroma endometrial; 2) diferenciação e crescimento do miométrio e 3) desenvolvimento coordenado das glândulas endometriais (BARTOL et al., 1999).

Histologicamente o endométrio é constituído por epitélio superficial simples cilíndrico, mas em áreas isoladas o epitélio pode ser cúbico. A camada superficial da lâmina própria consiste em tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado, com muitos fibroblastos, e inúmeros macrófagos e mastócitos estão presentes na lâmina própria. A camada profunda da lâmina própria submucosa consiste em tecido conjuntivo frouxo e é muito menos celular que a camada superficial (PRIEDKALNS, 1982).

O miométrio consiste em espessa camada circular interna e uma camada longitudinal externa de células musculares lisas que aumentam de número e tamanho durante a gestação. Entre as duas camadas ou profundamente na camada

interna, há uma zona vascular constituída de grandes artérias, veias e vasos linfáticos, os quais se comunicam com o endométrio (PRIEDKALNS, 1982).

O perimétrio consiste em tecido conjuntivo frouxo coberto pelo mesotélio peritoneal. Células musculares lisas, numerosos vasos linfáticos e sanguíneos e fibras nervosas estão presentes nesta camada (PRIEDKALNS, 1982).

Em 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). A característica histológica do útero de uma fêmea imatura pode assemelhar-se à do útero de uma fêmea em anestro (CHANDRA e ADLER, 2008).

Anatomicamente, a cérvix se mostra mais espessa que a vagina, apresentando uma projeção cilíndrica (ELLENPORT, 1986). De acordo com Priedkalns (1982), a histologia da cérvix é descrita como epitélio simples cilíndrico com muitas células mucigênicas e células caliciformes. Quantidades crescentes de muco são secretadas durante o estro e a gestação. Assim como na égua, na cadela, plexos venosos estão presentes na parte profunda da lâmina própria. Muitos pequenos feixes de fibras nervosas, ligeiramente mielínicos ou amielínicos estão presentes na lâmina própria e na túnica muscular. A túnica muscular consiste numa camada muscular lisa circular interna e uma camada longitudinal externa. Fibras elásticas são proeminentes na camada circular. As fibras, tanto musculares como elásticas são importantes no restabelecimento da estrutura cervical após o parto.

O sistema reprodutor da fêmea está sujeito a alterações cíclicas mais intensas que o do macho. Esta atividade cíclica da fêmea se manifesta macro e microscopicamente, assim como comportamentalmente (ALTMAN, 2004). O ciclo estral proporciona ao útero e principalmente ao endométrio alterações morfológicas e funcionais devido à influência da atividade endócrina do ovário (OEHLER et al., 2000). Pela ação dos estrógenos, com efeito proliferativo, tem-se hiperplasia endometrial, maior vascularização, maior fluxo sanguíneo e maior atividade metabólica, dilatação e relaxamento da cérvix, bem como migração de leucócitos polimorfonucleares para o lúmen uterino. Por outro lado, a progesterona promove proliferação e aumento da atividade secretória das glândulas endometriais, fechamento da cérvix, inibição da contratilidade miometrial, além de possuir um

efeito supressor da imunidade celular, por impedir a migração leucocitária para o lúmen uterino. Periodicamente, a mucosa uterina sofre profundas modificações, tanto sob o efeito estrogênico como sob o progesterônico (VERMEIRSCH et al., 1999; NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

2.1.2 Glândulas endometriais

As glândulas endometriais são estruturas presentes no endométrio que se apresentam histologicamente formadas de tecido conjuntivo apresentando epitélio simples cúbico ou cilíndrico baixo (MONTEIRO et al., 2009).

O útero de todos os mamíferos contém glândulas endometriais, as quais têm como funções sintetizar, secretar e transportar substâncias essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento do concepto. A idéia de que as secreções uterinas nutrem o concepto em desenvolvimento (embrião e membranas associadas) 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 para o bem-estar fetal em ruminantes (SPENCER e BAZER, 2004).

O crescimento do embrião inicialmente é dependente do endométrio e logo após, da placenta, a partir da placentação. 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 e BAZER, 2004).

A adenogênese endometrial é o processo de formação das glândulas uterinas e envolve diferenciação e aparecimento do epitélio glandular (EG) e do epitélio luminal (EL), penetração do estroma uterino por tubos de EG e extenso enrolamento e ramificação do EG (CARPENTER et al., 2003; SPENCER e 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 et al., 1979; GRAY et al., 2001). Estudos na última década, em que fatores responsáveis pela formação das glândulas uterinas foram desativados (animais “*uterine gland knockout - UGKO*”) em modelo ovino, demonstraram ainda mais a importância das glândulas e suas secreções na implantação e crescimento do embrião (GRAY et al., 2000, 2001, 2002).

No momento da implantação e do desenvolvimento embrionário, diversas alterações estão presentes em todo o corno uterino, como espessamento do endométrio (FELDMAN e 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 secreções ricas em proteínas (histótrofo ou leite uterino) que sustentam o desenvolvimento inicial do embrião e proporcionam a nutrição histotrófica antes da placentação (SAMUEL et al., 1977; FREMAN et al., 1990).

A compreensão dos mecanismos hormonal, celular e molecular que regulam o desenvolvimento uterino pós-fecundação e a adenogênese endometrial são importantes para determinar a funcionalidade do útero. Embora o funcionamento das glândulas endometriais tenha sido estabelecido na maioria dos mamíferos, os mecanismos que regulam seu desenvolvimento ainda não foram esclarecidos (GRAY et al., 2001).

A adenogênese apresenta-se na maioria dos mamíferos como um evento pós-natal e envolve complexas comunicações entre o epitélio e o mesenquima sendo mediada pela composição e distribuição da matriz extracelular, ligação de fatores de crescimento e hormônios esteróides a os seus receptores, formando glândulas firmemente enroladas e ramificadas no endométrio. Entretanto, há particularidades entre espécies quanto ao seu desenvolvimento (GRAY et al., 2001; STEWART et al., 2011).

2.1.3 Desenvolvimento das glândulas endometriais em diferentes espécies

2.1.3.1 Suínos

As glândulas endometriais estão ausentes ao nascimento, mas se desenvolvem de forma rápida e sincronizada durante a vida pós-natal precoce (SPENCER et al., 1993), ocorrendo sua formação num prazo de 120 dias do nascimento (BARTOL et al., 1993; TARLETON et al., 1998).

Ao nascimento, o útero do suíno consiste em um simples e ligeiramente ondulado epitélio colunar apoiado por desorganizado estroma mesenquimal, rodeado por um miométrio rudimentar (BARTOL et al., 1993; CHRISTENSON et al., 1997). Ao sétimo dia pós-nascimento glândulas tubulares espiraladas estão presentes em todo estroma superficial. Por volta do 14^o dia pós-nascimento, muitas glândulas tubulares enroladas estão aparentes e se estendem aproximadamente a um terço da distância do EL para o miométrio, que já se diferenciou em camadas circulares e longitudinias. No 28^o dia, muitas coleções de glândulas são evidentes, e EG está presente por todo o estroma endometrial. Além disso, dobras endometriais estão aparentes e aumentam a área da superfície uterina luminal. Aos 56 dias, a população de glândulas é densa e extensa e até o dia 120 pós-nascimento passa por um período de desenvolvimento e ramificação (SPENCER et al., 1993; CHRISTENSON et al., 1997; TARLETON et al. 1998). O útero suíno é capaz de suportar gestação a partir do dia 120 após o nascimento, indicando que está maduro e funcional (BARTOL et al., 1993).

2.1.3.2 Roedores

No útero de camundongas e ratas recém-nascidas, similarmente aos suínos, há ausência de glândulas endometriais, e o útero consiste de um epitélio simples apoiado por um mesênquima indiferenciado. No 5^o dia após o nascimento, invaginações epiteliais aparecem, o que representa a formação dos botões do EG

(BRODY e CUNHA, 1989). A gênese da glândulas endometriais não é observada até o 7º dia pós-nascimento em camundongas e 9º dia em ratas (BRANHAM et al, 1985). No útero de ratas a adenogênese progride do dia 9 pós-nascimento até o 15º dia (BRANHAM et al., 1985) e como resultado tem-se o desenvolvimento de glândulas tubulares simples que, ao contrário dos ungulados apresentam menor ramificação.

2.1.3.3 Humanos

Em humanos, embora a proliferação das glândulas endometriais seja iniciada durante a vida fetal (20 – 22 semanas de gestação) mesmo que superficialmente, esta somente é concluída após o nascimento, de forma semelhante ao observado em ungulados domésticos (BARTOL et al., 1993; BARTOL et al., 1999). Assim, a gênese das glândulas endometriais no feto e recém-nascido humano envolve a diferenciação desenvolvimento da EG e diferenciação de EL (GRAY et al., 2001).

Ao nascimento, a histoarquitetura endometrial se assemelha a do adulto, embora esteja menos desenvolvida. O EL endometrial neonatal é colunar baixo ou cubóide, e o EG é escasso e limitado ao estroma adluminal (GRAY et al., 2001). Desde o nascimento até o início da puberdade, as glândulas endometriais continuam seu desenvolvimento lentamente. Aos seis anos de idade, estas se estendem desde 1/3 à metade da distância do miométrio. A histoarquitetura de útero maduro é observada na puberdade com glândulas endometriais estendendo-se até a camada interna circular do miométrio (OKULICZ et al., 1997).

2.1.3.4 Ovinos e bovinos

O desenvolvimento endometrial em ovinos e bovinos inicia-se no período fetal (136 -250 dias de gestação em ovelhas e aos 250 dias de gestação em vacas), com pequenas invaginações no lúmem endometrial, que seriam o broto primordial das

glândulas endometriais (MARION e GIER 1971; ATKINSON et al., 1984; WILEY et al., 1987). Estas invaginações rasas no EL representam a formação primordial de EG (HAYASHI et al., 2011).

A continuação do desenvolvimento das glândulas endometriais pós-natal nos ovinos e bovinos envolve o surgimento e a proliferação das glândulas no endométrio, desenvolvimento de dobras endometriais, e em menor medida, o crescimento do endométrio e da área caruncular no endométrio (WILEY et al., 1987; BARTOL et al., 1993; BARTOL et al., 1999; TAYLOR et al., 2000). O progressivo desenvolvimento do EG endometrial, do EL para a camada interior circular do miométrio é um evento coordenado que envolve a formação de brotos e é concluída com enrolamento e ramificação (SPENCER e BAZER, 2004).

O período de desenvolvimento das glândulas endometriais em ovinos é entre o nascimento e o 7º dia pós-natal, caracterizado por invaginações epiteliais superficiais que aparecem ao longo do EL em áreas intercarunculares (BARTOL et al., 1988; TAYLOR et al., 2000). Entre os dias 7 e 14, aparecem as formações iniciais do EG que proliferam e invaginam no estroma, formando estruturas tubulares e ramos. Depois de 21 dias, a maioria das atividades morfogenéticas envolvem a morfogênese da ramificação tubular das glândulas endometriais e a formação terminal de estruturas espiraladas mais profundas no estroma. Ao redor do dia 56 pós-nascimento, as áreas endometriais caruncular e intercaruncular são histologicamente semelhantes as do útero adulto (TAYLOR et al., 2000).

2.1.3.5 Equinos

O desenvolvimento endometrial desta espécie ocorre a partir da segunda metade da gestação, onde se encontra ainda de maneira rudimentar, com lúmen endometrial colunar simples e presença de dobras endometriais (150 -160 dias de gestação). Com 250 dias de gestação o epitélio luminal apresenta sinais de invaginações em seu estroma, com 300 dias ambos, números e profundidade das invaginações, estão ainda mais presentes no epitélio luminal e estas aumentam até o nascimento (ALLEN e ERSTENBERG, 2000).

O desenvolvimento dessas estruturas consideradas estruturas rudimentares das glândulas endometriais, são observadas em potras com 5 a 7 semanas de nascimento e após este período inicial de crescimento as glândulas se desenvolvem principalmente durante o estro até a puberdade, sendo que, o final da diferenciação e maturação das glândulas ocorrem apenas após a primeira ovulação (GINTHER, 1979; ALLEN e ERSTENBERG, 2000).

2.2 Regulação da morfogênese das glândulas endometriais

A morfogênese uterina é regulada por vários mecanismos endócrinos, celulares e moleculares, muitos ainda desconhecidos (CUNHA et al., 1983; BARTOL et al., 1993, 1999; GRAY et al., 2001). De acordo com Spencer e Bazer (2004), provavelmente esse desenvolvimento uterino envolva a) alterações locais específicas em proliferação e movimento celular; b) ações parácrinas, célula-célula e célula-meio; c) ações específicas endócrinas, parácrinas e fatores agindo com seus receptores.

2.2.1 Fatores de crescimento

Fatores de crescimento derivados do estroma possuem papel importante na proliferação e diferenciação epitelial e na morfogenia de ramificação dentro de muitos órgãos de epitélio mesenquimal em desenvolvimento, inclusive o útero (GRAY et al., 2000; TAYLOR et al., 2001). Interações entre fatores de crescimento e seus receptores podem envolver elementos da matriz extracelular que não só afetam padrões de apresentação de fator de crescimento para atingir as células alvo, mas também podem participar como elementos complexos de receptores da

superfície celular, como demonstrado para o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (MCKEEHAN et al., 1998).

No útero de ovinos neonatos, os fatores de crescimento de fibroblasto 7 e 10 (FGF-7 e FGF-10), fatores de crescimento semelhantes a insulina I e II (IGF-I e IGF-II), e o sistema activina-folistatina foram identificados como candidatos a regular os sistemas da adenogênese endometrial (GRAY et al., 2000b; TAYLOR et al., 2000; TAYLOR et al., 2001; HAYASHI et al., 2003). Cada um destes fatores de crescimento têm receptores que são expressos no epitélio endometrial.

Embora muitos estudos tenham promovido o conceito de que fatores de crescimento predominantemente regulam a morfogênese e a diferenciação funcional do órgão, recentes evidências indicam que fatores de crescimento sistêmico, como IGF-I, podem ser mais importantes que previamente pensava-se para crescimento do útero e outros tecidos (SATO et al., 2002). Assim, o desenvolvimento uterino será regulado por uma cuidadosa e orquestrada rede de fatores de crescimento e hormônios de diferentes locais e origens sistêmicas (SPENCER e BAZER, 2004).

2.2.2 Ovários

Em roedores, os eventos pós-natais de desenvolvimento uterino são independentes da ação dos ovários e adrenais (GRAY et al., 2001). Em suínos neonatos, Tarleton et al. (1998) determinaram que a ovariectomia ao nascimento não afeta a gênese das glândulas uterinas ou eventos morfogenéticos endometriais relacionados antes do dia 120 pós-nascimento, mas há diminuição do peso uterino após o dia 60 do nascimento. Semelhantemente, ovariectomia em cordeiros ao nascimento não afetaram os padrões de gênese das glândulas uterinas aos 14 pós-nascimento (BARTOL et al., 1988b), mas reduziu o peso uterino após o dia 28 (KENNEDY et al., 1974).

Entretanto, novos estudos têm demonstrado que fatores ovarianos apresentam importância na regulação da adenogênese endometrial (SPENCER e BAZER, 2004). Os fatores ovarianos podem ser secretados devido ao abundante

crescimento de folículos antrais no ovário, e estes possíveis fatores incluem a folistatina, ativina e inibina (CARPENTER et al., 2003c), e também o IGF. Especula-se que uma atividade coordenada do sistema ativina-inibina-folistatina no ovário e útero seja importante em raças prolíferas de ovelhas que possuem altas taxas de ovulação, como também aumenta a capacidade uterina de manter grandes ninhadas (FAHMY, 1996).

Embora a adenogênese endometrial seja aparentemente um evento independente dos ovário e de esteróides em suínos recém-nascidos, a gênese das glândulas endometriais em roedores, suínos e ovinos envolve mudanças coordenadas no fenótipo epitelial do útero, marcado pela expressão de receptores de estrógeno-alfa (RE- α) ao nascimento e proliferação de glândulas endometriais (GRAY et al., 2000; TAYLOR et al., 2000). Como o RE- α não regula as fases iniciais da adenogênese endometrial em ovelhas neonatais, mas parece influenciar o enrolamento e ramificação das glândulas endometriais, pode-se dizer que o papel relatado do RE- α no desenvolvimento das glândulas endometriais pode ser espécie e fase-específico (TARLETON et al., 2003).

2.2.3 Receptores para estrógenos e progesterona

Alterações morfo-fisiológicas que ocorrem no útero de cadelas durante o ciclo estral devem-se a influência dos hormônios esteróides e de sua interação com seus receptores específicos nas células, sendo a regulação da presença desses receptores (receptores de estrógeno-RE e receptores de progesterona-RP) realizada pela ação desses esteróides (OEHLER et al., 2000).

A maior expressão nuclear de RE durante o proestro no endométrio evidencia a influência positiva da concentração elevada de estrógenos neste momento, proporcionando uma maior susceptibilidade do tecido uterino ao efeito proliferativo do estradiol, onde este efeito caracteriza-se pela intensa atividade mitótica do epitélio glandular, das células estromais e do endotélio vascular (DE COCK et al., 1997; VERMEIRSCH et al., 1999).

Durante o estro verifica-se uma diminuição dos RE em todos os grupos celulares, coincidindo com o aumento das concentrações de progesterona e aumento de RP, o que ocorre antes da ovulação (DE COCK et al., 1997; VERMEIRSCH et al., 1999). A progesterona tem um importante papel para manutenção da gestação por preparar o epitélio uterino através da diferenciação do estroma endometrial, proporcionando ambiente adequado para implantação do embrião (LYDON et al., 1995).

Os estrógenos apresentam como característica o estímulo a síntese (*up-regulation*) dos seus próprios receptores e também de RP, após a interação do RE ativado com o DNA, com aumento da transcrição do RNAm específico para a síntese de RE e RP, possibilitando a resposta celular aos hormônios específicos. A progesterona, por sua vez, exerce um efeito de regulação negativa (*down-regulation*), tanto em relação ao RE como ao RP, em nível do processo de transcrição (VERMEIRSCH et al., 2000).

Em geral, a expressão endometrial de RE parece ser a chave para a regulação da formação das glândulas endometriais em várias espécies, embora com mecanismos diferentes (STEWART et al., 2011).

3. CAPÍTULO 1 - DESENVOLVIMENTO UTERINO EM CADELAS DO NASCIMENTO AOS SEIS MESES DE IDADE: ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

José Leonardo Gualberto Ramos¹, Cristina Leite Francisco Gualberto Ramos³, Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho², Eduardo Shimoda⁴, Marcelo Rezende Luz^{1,5}

Artigo a ser submetido à publicação na revista
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Desenvolvimento uterino em cadelas do nascimento aos seis meses de idade: Análise histomorfométrica

Uterine development in the bitch from birth to six months of age: Histomorphometric analysis

José Leonardo Gualberto Ramos¹, Cristina Leite Francisco Gualberto Ramos², Eulógio

Carlos Queiroz de Carvalho³, Eduardo Shimoda⁴, Marcelo Rezende Luz^{1,5}

¹ Laboratório de Reprodução Animal – Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alto Universitário s/n, Alegre - ES, Brasil, 29500-000

² Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes - RJ, Brasil, 28100-000

³ Laboratório de Morfologia e Patologia Animal – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes - RJ, Brasil, 28100-000

⁴ Universidade Cândido Mendes, Instituto Candido Mendes - Rua Anita Peçanha, 100 - Pq. São Caetano, Campos dos Goytacazes, RJ – Brasil 28100-000

⁵ Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Departamento Clínica e Cirurgia Veterinárias – Setor de Reprodução Animal – Av. Antônio Carlos, 6627 – Caixa Postal 567, Campus Pampulha, Belo Horizonte – MG, Brasil, 30123-970

3.1 RESUMO

Com o objetivo de caracterizar o desenvolvimento histológico uterino do nascimento aos seis meses de idade, foram analisados úteros de 32 cadelas, com idades entre um e 180 dias pós-nascimento (DPN), distribuídos em oito grupos: G1 – 1 DPN, G2 – 15 DPN, G3 – 30 DPN, G4 – 45 DPN, G5 – 60 DPN, G6 – 90 DPN, G7 – 120 DPN e G8 - 180 DPN. Cada grupo foi composto por quatro animais. A análise histológica constituiu de mensuração da espessura total (μm) da parede uterina, espessura (μm) do miométrio, espessura (μm) do endométrio, diâmetro (μm) e número de glândulas endometriais. A análise estatística demonstrou estabilidade e homogeneidade nas estruturas avaliadas com coeficientes de variação baixos ($< 10\%$) em todas variáveis. O útero das fêmeas recém-nascidas (1 DPN) apresentou epitélio com células cúbicas simples, miométrio rudimentar, presença de perimétrio e ausência de glândulas endometriais; aos 15 DPN observou-se o desenvolvimento de estrutura primordial de formação das glândulas endometriais; dos 30 aos 45 DPN observou-se endométrio e glândulas endometriais simples; aos 60 DPN observaram-se glândulas endometriais em lâmina própria com ramificações e discreto pregueamento endometrial; de 90 a 180 DPN todas as estruturas uterinas apresentaram histoarquitetura de um animal maduro, com maior número de glândulas endometriais em lâmina própria. Todas as variáveis analisadas apresentaram correlação positiva com a idade pós-nascimento: parede uterina total ($R^2=97,4\%$), endométrio total ($R^2=99,4\%$), miométrio total ($R^2=95,8\%$), n° de glândulas ($R^2=92,3\%$); diâmetro das glândulas ($R^2=94,1\%$) e altura do epitélio ($R^2=72,2\%$). Conclui-se que o útero da cadela desenvolve-se continuamente entre o nascimento e 180 dias pós-nascimento e que o mesmo apresenta-se desprovido de glândulas endometriais ao nascimento. As primeiras glândulas endometriais são observadas aos 15 dias pós-nascimento e apresenta conformação histológica de um animal adulto após 60 dias do nascimento.

Palavras-chave: glândulas endometriais, útero, desenvolvimento, histologia, cadela.

3.2 ABSTRACT

With the aim of studying the histological changes that occur in the development of uterine puppies prepubertal dogs were analyzed uteri of 32 dogs, aged between one and 180 days postnatal (DPN). The animals were divided into eight groups: G1 - 1 DPN, G2 - 15 DPN, G3 - 30 DPN, G4 - 45 DPN, G5 - 60 DPN, G6 - 90 DPN, G7 - 120 G8 and DPN - 180 DPN. Each group consisted of four animals. Histological analysis was to measure the total thickness (μm) of the uterine wall thickness (μm) of the myometrium, thick (μm) of the endometrium, diameter (mm) and number of endometrial glands. Statistical analysis showed stability and homogeneity structures evaluated with low coefficients of variation $<10\%$ for all variables. The uterus of female newborn (PND 1) showed epithelium with simple cuboidal cells, myometrium rudimentary perimetrium presence and absence of endometrial glands; to 15 DPN observed the development of primary structure formation of endometrial glands; from 30 to 45 DPN observed endometrium and endometrial glands simple; DPN at 60 endometrial glands were observed in the lamina propria with branches and discreet pleating endometrial; 90-180 DPN all uterine structures histoarchitecture showed a mature animal, with larger glands endometrial lamina propria. All variables were positively correlated with age after birth: total uterine wall ($R^2 = 97.4\%$), endometrial total ($R^2 = 99.4\%$), total myometrium ($R^2 = 95.8\%$), No. gland ($R^2 = 92.3\%$); diameters glands ($R^2 = 94.1\%$) and epithelial height ($R^2 = 72.2\%$). It is concluded that the dog uterus continuously evolves between birth and 180 days after birth and that it presents itself devoid of endometrial glands birth. The first endometrial glands are observed at 15 days after birth and presents conformation characteristic of an adult animal after 60 days of birth.

Keywords: endometrial glands, uterus, development, histology, bitch.

3.3 INTRODUÇÃO

O crescimento e desenvolvimento de um concepto dependem inicialmente do endométrio que primariamente fornece a nutrição pelas secreções produzidas pelas glândulas endometriais. As glândulas endometriais estão presentes no útero de todos os mamíferos e sua gênese envolve diferenciação e desenvolvimento do epitélio glandular (EG), do epitélio luminal (EL) e a penetração do estroma uterino por tubos e extenso enrolamento e ramificação do EG (SPENCER e BAZER, 2004). Embora o papel funcional das glândulas endometriais tenha sido estabelecido na maioria dos mamíferos, mecanismos que regulam o desenvolvimento delas em animais domésticos, de laboratório e humanos ainda não são entendidos (GRAY et al., 2001).

Eventos morfogenéticos comuns ao desenvolvimento de todo útero incluem: diferenciação e crescimento do miométrio; diferenciação e morfogenia das glândulas endometriais e organização e estratificação do estroma endometrial (BARTOL et al., 1993 1999; GRAY et al., 2000). O desenvolvimento uterino é iniciado no feto, mas só é completado com diferenciação e desenvolvimento das glândulas endometriais no período pós-nascimento (SPENCER e BAZER, 2004). Os mecanismos que regulam a diferenciação uterina neonatal e a formação das glândulas endometriais são complexos e envolvem complicadas interações entre o epitélio e mesênquima e são mediados pela composição e distribuição da matriz extracelular, presença de fatores de crescimento e expressão de receptores de hormônios esteróides (STEWART et al., 2011).

Os eventos cronológicos da morfogênese das glândulas endometriais são conhecidos em várias espécies, como ovinos, roedores, suínos, bovinos e humanos (GRAY et al., 2001). Entretanto, na espécie canina estes eventos não foram descritos, sendo apenas apresentados estudos histológicos e morfométricos em casos de processos patológicos como hiperplasia cística endometrial (HCE) e piometra (DE BOSSCHERE et al., 2001; WEISS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008), efeitos do uso de contraceptivos na histoarquitetura uterina (SOKOLOWSKI e VAN RAVENSWAAY, 1976; MONTEIRO et al., 2009), comparação entre nulíparas e

multíparas (AUGSBURGER e KURZI, 2004; MONTEIRO et al., 2009) e diferenças histológicas nas diferentes fases do ciclo estral (GALABOVA et al., 2003).

Devido a ausência de estudos na espécie canina em relação à gênese das glândulas endometriais, este estudo teve como objetivo caracterizar o desenvolvimento uterino em cadelas pré-púberes, desde o primeiro dia pós-nascimento até o sexto mês de idade.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados úteros de 32 cadelas pré-púberes, com ou sem raça definida, com idades entre um e 180 dias pós-nascimento (DPN), de diferentes ninhadas.

Os animais foram distribuídos em oito grupos experimentais de acordo com a idade: G1 - 1 DPN (n=4); G2 - 15 DPN (n=4); G3 - 30 DPN (n=4); G4 - 45 DPN (n=4); G5 - 60 DPN (n=4); G6 - 90 DPN (n=4); G7 - 120 DPN (n=4) e G8 - 180 DPN (n=4).

As coletas dos úteros foram realizadas em neonatos natimortos (G1), filhotes que vieram a óbito no decorrer de seu desenvolvimento, sem afecções uterinas (G2 a G7) ou após ovariosalpingohisterectomia (OSH) (G8). Nos animais do G1 as coletas foram realizadas em até duas horas do óbito.

Para a OSH as cadelas foram submetidas a jejum sólido de 12 horas e hídrico de 6 horas. Previamente ao procedimento cirúrgico, as cadelas foram submetidas a fluidoterapia intravenosa com solução de NaCl 0,9%. Em seguida, foi administrado sulfato de atropina (0,044mg/kg/SC) e 15 minutos após, cloridrato de xilazina 2% (1,5mg/kg/IM). A indução anestésica foi feita com tiopental sódico 2,5% (12,5mg/kg/IV). Após a intubação orotraqueal, a anestesia foi mantida com halotano em circuito com reinalação parcial de gases.

A analgesia pós-operatória foi realizada com flunixin meglumine (1,0 mg/kg/IM) durante três dias. O antibiótico utilizado no pós-operatório foi enrofloxacin na dose de 5 mg/kg, por via IM, a cada 12h, durante sete dias.

Para avaliação histológica, fragmentos de 0,5 cm do terço médio dos cornos uterinos foram colhidos e fixados em paraformaldeído tamponado a 10%. Posteriormente, foram processados e incluídos em parafina (JUNQUEIRA, 1995). Cortes histológicos de 3-5 μm de espessura foram submetidos a desparafinização seguindo protocolo padrão, foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e examinados ao microscópio de luz sob aumentos de 10 a 100x.

Foram analisados o tipo de epitélio superficial, presença e quantidade de glândulas endometriais e as disposições das fibras do tecido conjuntivo do endométrio e das fibras do estrato muscular. As mensurações efetuadas foram: espessura total da parede uterina (μm), espessura total do miométrio (μm) e endométrio total (μm), em 5 campos diferentes de cada amostra histológica; diâmetro (μm) das glândulas endometriais, sendo analisadas 10 glândulas em cada amostra histológica, e o número de glândulas endometriais/ mm^2 , utilizando-se do aumento de 10x.

As mensurações foram realizadas utilizando-se o programa Imaje J 1.43u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

Os resultados das avaliações histológicas foram apresentados de forma descritiva. Os dados foram analisados utilizando análise de regressão com uso do Sistema para Análises Estatísticas (SAEG), versão 9.1 (2007). As variáveis analisadas foram espessura total da parede uterina (μm), espessura total do miométrio (μm) e endométrio total (μm), diâmetro (μm) das glândulas endometriais e o número de glândulas endometriais/ mm^2 , observando a interação destas com a idade pós-nascimento. Foram demonstradas médias, erro padrão e coeficiente de variação. Foi considerado o nível de significância de 5 %.

3.5 RESULTADOS

Descrição histológica

A análise histológica do útero dos animais do G1 ao G8 revelou (Figura 1):

Fêmeas com 1 dia de idade (G1): Endométrio com presença de epitélio colunar com células cúbicas simples apoiadas sobre estroma mesenquimal em organização. Miométrio rudimentar envolvendo a lâmina própria (lúmen endometrial), e ausência de glândulas endometriais. Perimétrio presente constituído de tecido conjuntivo e revestido por mesotélio.

Fêmeas com 15 dias de idade (G2): Endométrio com epitélio cúbico simples, presença de glândulas endometriais tubulares rudimentares e presença de pequenas invaginações no lúmen endometrial. Miométrio rudimentar, pouco definido, com presença de pequenos vasos sanguíneos. Perimétrio constituído de tecido conjuntivo.

Fêmeas com 30 a 45 dias de idade (G3 e G4): Endométrio com epitélio cúbico simples, com lâmina própria e presença de glândulas endometriais simples, com poucas ramificações. Miométrio constituído por músculo liso e estrato vascular presente com discreta presença de vasos. Perimétrio constituído de tecido conjuntivo frouxo.

Fêmeas com 60 dias de idade (G5): Endométrio com epitélio cúbico simples, discreto pregueamento, lâmina própria com presença de glândulas endometriais tubulares ramificadas. Miométrio constituído por camadas de músculo liso (miométrio interno e externo), extrato vascular com vasos sanguíneos de diferentes calibres. Perimétrio presente e constituído de tecido conjuntivo frouxo.

Fêmeas com 90, 120 e 180 dias de idade (G6, G7 e G8): Estrutura histológica similar aos animais do G4 e G5, endométrio com epitélio cúbico simples, discreto pregueamento, lâmina própria com presença de glândulas endometriais, diferindo apenas na presença de maior quantidade destas. Miométrio constituído por camadas de músculo liso e extrato vascular com vasos sanguíneos de diferentes calibres. Perimétrio presente e constituído de tecido conjuntivo frouxo.

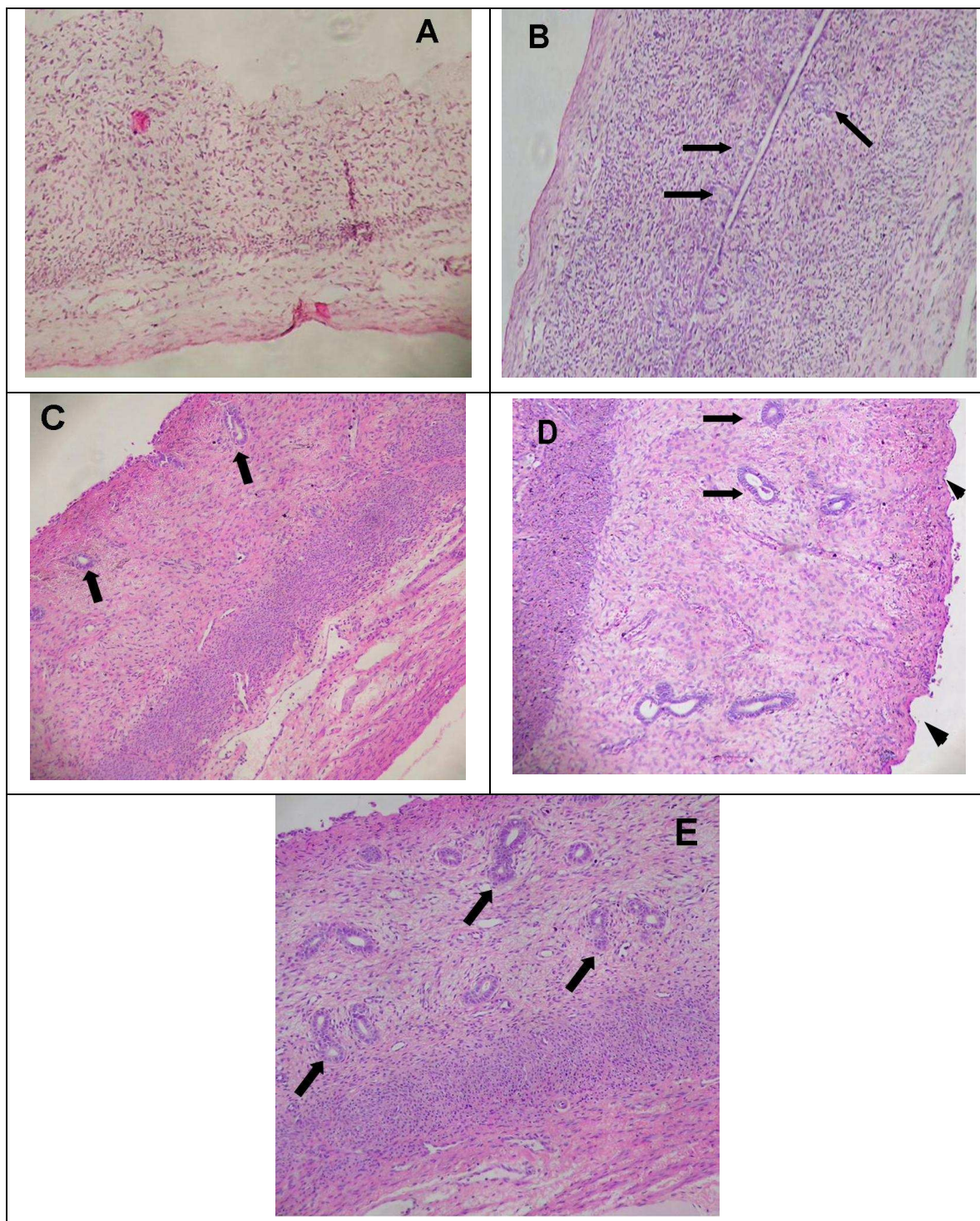


Figura 1. Fotomicrografias do útero de cadelas do nascimento aos seis meses de idade. A) 1 DPN – Útero com ausência de glândulas endometriais; B) 15 DPN – Presença de glândulas endometriais rudimentares (setas); C) 30 DPN e 45 DPN – Glândulas endometriais simples, poucas ramificações (setas); D) 60 DPN – Glândulas endometriais simples (setas) e início de pregueamento do endométrio (cabeças de seta); E) 120 DPN e 180 DPN - Aumento do número de glândulas presentes em lâmina própria (setas) - Obj. 10x/HE.

Mensurações das estruturas uterinas

Os animais do G1 apresentaram estrutura uterina simples, o que possibilitou apenas mensurar a parede uterina total, a qual apresentou $239,67 \pm 2,73$ mm, e ausência de estruturas glandulares em lâmina própria. A mensuração de endométrio e miométrio separadamente não foi possível devido a característica rudimentar destes tecidos em formação.

Nos animais do G2, G3 e G4 foi possível mensurar estruturas uterinas diferenciadas como parede uterina total, endométrio, miométrio, número e diâmetro das glândulas, cujos resultados estão apresentados na Tabela 1.

Nos animais do G5, G6, G7 e G8 foi possível avaliar todas as estruturas anteriormente citadas, além da possibilidade de se avaliar a altura do epitélio, e o desenvolvimento das estruturas com o aumento da idade. Além disso, foi observada estabilidade e homogeneidade das estruturas avaliadas (Tabela 1). Observou-se correlação significativa ($P < 0,0001$) entre todas as variáveis analisadas com a idade animal [parede uterina total ($R^2=97,4\%$), endométrio total ($R^2=99,4\%$), miométrio total ($R^2=95,8\%$), número de glândulas endometriais ($R^2=92,3\%$); diâmetro das glândulas endometriais ($R^2=94,1\%$) e altura do epitélio ($R^2=72,2\%$).

Tabela 1 – Dados histomorfométricos do útero de cadelas pré-púberes com idades entre 1 e 180 dias pós-nascimento (médias \pm EP; CV).

Variável Grupos	Variável					
	EPU (μm)	EM (μm)	EE (μm)	N° GI (mm^2)	DGI (μm)	AE (μm)
G1: 1DPN	239,67 $\pm 2,73$ (CV=1,14)	---	---	---	---	---
G2: 15 DPN	281,47 $\pm 2,12$ (CV=0,75)	231,38 $\pm 1,94$ (CV=0,84)	51,98 \pm 1,09 (CV=2,10)	1,60 \pm 0,15 (CV=9,51)	10,10 \pm 0,17 (CV=1,71)	---
G3: 30 DPN	319,98 $\pm 2,21$ (CV=0,69)	260,47 $\pm 1,68$ (CV=0,65)	61,33 \pm 1,02 (CV=1,66)	3,90 \pm 0,16 (CV=4,12)	11,82 \pm 0,16 (CV=1,36)	---
G4: 45 DPN	451,66 $\pm 3,99$ (CV=0,88)	366,47 $\pm 3,31$ (CV=0,90)	87,21 \pm 1,34 (CV=1,53)	3,85 \pm 0,20 (CV=5,08)	18,76 \pm 0,19 (CV=0,99)	---
G5: 60 DPN	496,77 $\pm 1,44$ (CV=0,29)	399,31 $\pm 0,96$ (CV=0,24)	99,51 \pm 1,04 (CV=1,05)	6,00 \pm 0,19 (CV=3,20)	21,37 \pm 0,13 (CV=0,59)	4,66 \pm 0,08 (CV=1,68)
G6: 90 DPN	669,88 $\pm 6,14$ (CV=0,92)	540,68 $\pm 5,10$ (CV=0,94)	132,11 $\pm 1,24$ (CV=0,94)	7,80 \pm 0,22 (CV=2,88)	22,37 \pm 0,10 (CV=0,43)	4,87 \pm 0,08 (CV=1,65)
G7: 120DPN	875,06 $\pm 8,66$ (CV=0,99)	705,62 $\pm 7,40$ (CV=1,05)	179,27 $\pm 5,53$ (CV=3,08)	10,35 \pm 0,24 (CV=2,35)	23,59 \pm 0,09 (CV=0,37)	5,09 \pm 0,03 (CV=0,62)
G8: 180DPN	978,61 $\pm 9,70$ (CV=0,99)	693,77 $\pm 6,99$ (CV=1,01)	301,68 $\pm 2,16$ (CV=0,71)	11,50 \pm 0,59 (CV=5,11)	24,37 \pm 0,14 (CV=0,59)	5,55 \pm 0,07 (CV=1,27)

EPU = Espessura de parede uterina; EM = Espessura de miométrio; EE= Espessura de endométrio; N° GI= Número de glândulas endometriais; D GI= Diâmetro das glândulas endometriais; AE = Altura do Epitélio; DPN = Dias pós-nascimento; CV=Coeficiente de Variação %; EP= erro padrão; --- = não avaliado.

3.6 DISCUSSÃO

No presente estudo, as fêmeas com um dia pós-nascimento apresentaram útero com epitélio colunar cúbico simples e ausência de glândulas endometriais, as quais começaram a ser identificadas, mesmo que em suas estruturas ainda rudimentares, a partir do décimo quinto dia pós-nascimento e apresentando sua histoarquitetura histológica típica de uma fêmea madura após o sexagésimo dia pós-nascimento. Estes achados estão de acordo com o descrito por Gray et al. (2001) e Yin e Ma (2005) que descreveram a adenogênese uterina como um evento pós-nascimento na maioria dos mamíferos, com evolução altamente espécie específica e caracterizada pela diferenciação do epitélio glandular a partir do epitélio luminal (BARTOL et al., 1993, 1999; GRAY et al., 2000). Em roedores a invaginação epitelial é primeiramente observada com cinco DPN, porém em bovinos, ovinos e suínos observa-se já no dia pós-nascimento. Todavia, o desenvolvimento uterino em alguns animais (humanos, outros primatas e eqüinos) é iniciado no feto (vida intrauterina), mas só é completado com diferenciação e desenvolvimento das glândulas endometriais no período pós natal (SPENCER e BAZER, 2004; YIN e MA, 2005). Não é descrito na literatura o porque da diferença entre as espécies do desenvolvimento uterino e principalmente das glândulas endometriais pré ou pós nascimento, porém, a chave deste desenvolvimento pode estar na similaridade do desenvolvimeto entre os animais das espécies prolíferas (ratas, suínos e cães) e espécies menos prolíferas (humanos, outros primata e eqüinos).

As primeiras glândulas endometriais foram observadas aos 15 DPN, porém apresentaram-se morfológicamente desenvolvidas apenas aos 60 dias pós-nascimento. Comparativamente, porcas também nascem com ausência de glândulas em seu endométrio, mas por volta de 56 DPN a população de glândulas é densa e extensa (SPENCER et al., 1993; CHRISTENSON et al., 1997; TARLETON et al., 1998; YIN e MA, 2005, MONTEIRO e CARVALHO 2006). Em ovelhas, o desenvolvimento glandular é iniciado entre o nascimento e sete DPN com a histoarquitetura semelhante a do útero adulto por volta de 56 DPN (TAYLOR et al., 2000; YIN e MA, 2005). No útero de ratas a adenogênese inicia-se entre os dias

cinco e nove pós-nascimento e completa-se por volta do dia 15 DPN (BRANHAM et al., 1985; YIN e MA, 2005). Como nos suínos, ovinos e ratas a cadela apresenta desenvolvimento glanular endometrial pós nascimento, apresentando como característica reprodutivas similar entre essas espécies a serem prolíferas e apresentar rápido início da maturidade sexual.

Como esperado, no presente estudo a espessura da parede uterina total variou crescentemente entre um e 180 DPN ($239,67 \pm 2,73$ a $978,61 \pm 9,70 \mu\text{m}$). A espessura total média aos 180 DPN foi inferior a observada por Monteiro et al. (2009) em cadelas nulíparas, com idade variando entre três meses e dois anos, que obtiveram $1272,9 \pm 159,4 \mu\text{m}$. As mensurações de endométrio também foram inferiores em comparação a estes autores ($301,68 \pm 2,16$ versus $611,0 \pm 55,9 \mu\text{m}$). Estas diferenças podem ser explicadas pelo fato de os animais do presente experimento serem pré-púberes, ou seja, ainda não tinham sofrido as intensas atividades ocasionadas pelos esteróides sexuais durante o ciclo estral.

O miométrio das cadelas estudadas apresentou-se indiferenciado nos animais com um dia pós-nascimento, rudimentar e com pequenos vasos sanguíneos aos 15 DPN, e com formação completa entre o 30º e 45º dias pós-nascimento, com aumento de sua espessura ao decorrer do tempo. Estes resultados estão de acordo com Ceroula et al. (1983) que relataram aumento da espessura do miométrio em suínos após 45 DPN.

Com relação ao perimétrio das cadelas estudadas, o mesmo esteve presente em todos os grupos estudados, desde um até 180 DPN. Todavia, inicialmente era constituído por uma camada espessa de tecido conjuntivo frouxo revestido por mesotélio, e apresentando características típicas de um animal adulto a partir de 60 DPN. Similarmente, Banks (1992) e Carvalho e Monteiro (2006) relataram que em suínos pré-púberes o perimétrio era típico e constituído de tecido conjuntivo frouxo sendo o mesmo descrito por Augsburger e Kurzi (2004) em cadelas da raça Beagle nulíparas e múltíparas.

No presente estudo evidenciou-se que o útero da cadela apresenta desenvolvimento contínuo, desde o nascimento até o período de 180 DPN, com melhor caracterização e evidenciação de suas estruturas, principalmente das glândulas endometriais, aos 60 DPN. Entretanto, em estudos realizados por Erices e

Schnurrbusch (1979), foi observado que na espécie suína o desenvolvimento uterino não é contínuo, havendo maior crescimento do endométrio e miométrio aos três meses de idade, com pouca variação no número de glândulas e do endométrio após este período, e revelando estabilidade do crescimento aos 180 dias pós-nascimento. De acordo com Bartol et al. (1993), as transformações morfológicas do desenvolvimento uterino em suínos ocorrem do período pós-nascimento até o quarto mês de vida, com aparecimento e desenvolvimento de glândulas endometriais, aparecimento de dobras no endométrio e desenvolvimento do miométrio. Monteiro e Carvalho (2006) trabalhando com suínos concluíram que existem diferenças evidentes na evolução entre os órgãos das fêmeas recém-nascidas e pré-púberes, não ocorrendo o mesmo entre as porcas pré-púberes e púberes. O que observamos na cadela é um desenvolvimento contínuo do útero desde o nascimento até os 180 DPN e apresenta intensas modificações sobre ação dos hormônios gonadais (estrógeno e progesterona), principalmente pós puberdade ocasionando intensas modificações nas estruturas uterinas e principalmente das glândulas endometriais.

Com a realização das análises de regressão, pôde-se observar correlação positiva e significativa ($P < 0,0001$) entre todas as variáveis (espessura total da parede uterina, espessura total do miométrio, endométrio total do endométrio, diâmetro das glândulas endometriais e número de glândulas endometriais/mm²) com a idade do animal, e por meio das equações de regressão quadráticas, foi demonstrado que a partir de determinado momento as estruturas avaliadas não mais se alteram, ou seja, atingem estabilidade, desde que isentas de influências biológicas, como alterações hormonais, afecções, ou da própria idade do animal.

3.7 CONCLUSÕES

Conclui-se que o útero da cadela desenvolve-se continuamente entre o nascimento e 180 dias pós-nascimento e que o mesmo apresenta-se desprovido de glândulas endometriais ao nascimento. As primeiras glândulas endometriais são observadas aos 15 dias pós-nascimento e o útero canino apresenta conformação morfológica de um animal adulto após 60 dias do nascimento.

3. 8 AGRADECIMENTOS

A Fundação de Apoio a Ciência e Tecnologia do Espírito Santo – FAPES, pela concessão da bolsa de estudo; A Professora Dra. Isabel Candia Nunes da Cunha, da UENF, pela concessão do Laboratório para realização em conjunto do desenvolvimento da dissertação.

3.9 REFERÊNCIAS

ALLEN, W. R., ERSTENBERG, C. Development of equine endometrial glands from fetal life to ovarian cyclicity. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 56, p. 317 – 326, 2000.

AUGSBURGER R.H., KURZI M. Histomorphologic and morphometric evaluation of the uterine horns in nulliparous and multiparous beagles. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 5, p. 552-558, 2004.

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 Supplement**, v.48, p.99–116, 1993.

BARTOL, F.F., WILEY, A.A., FLOYD, J.G., OTT, T.L., BAZER, F.W., GRAY, C.A., SPENCER, T.E. Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 54, p.287–302, 1999.

BRANHAM, W.S., SHEEHAN, D.M. Ovarian and adrenal contributions to postnatal growth and differentiation of the rat uterus. **Biology of Reproduction**, v.53, p.863–872, 1995.

CHRISTENSON, R.K., BARTOL, F.F., VALLET, J.L., WILEY, A.A., SPENCER, T.E. Comparative study of uterine morphogenesis and protein secretion in neonatal White crossbred and Meishan gilts. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1112– 1129, 1997.

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

ERICES, J., SCHNURRBUSCH, U. Uterus development in swine from birth to 8 months of age. **Archive fur Experimentelle Veterinarmedizin**, v.33, n.3, p.457-473, 1979.

GALABOVA G., EGERBACHER M., AURICH J. E., LEITNER M. & WALTER I. Morphological changes of the endometrial epithelium in the bitch during metoestrus and anoestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 5, p. 415-20, 2003.

GRAY, C. A., BARTOL, F. F., TAYLOR, K. M., WILEY, A. A., RAMSEY, W. S., OTT, T. L., BAZER, F. W., SPENCER, T. E. Ovine uterine gland knock-out model: Effects of gland ablation on the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.62, p.448–456, 2000.

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.

JUNQUEIRA, L.C.U. Histology revisited – Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. **Ciência Cultura**, v.47, p.92-95, 1995.

MONTEIRO, C.M.R., PERRI, S.H.V., CARVALHO, R.C., KOIVISTO, M.B. Histologia e morfometria em cornos uterinos de cadelas nulíparas, múltiparas e tratadas com contraceptivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.847-851, 2009.

MONTEIRO, C. M. R., CARVALHO, R. C. Caracterização histológica do útero, tubas uterinas e ovários de fêmeas recém-nascidas, pré-púberes e púberes de suínos mestiços (*Sus scrofa domestica* – L. 1758) **ARS Veterinaria**, v. 22, p.223-228, 2006.

Sistema para Análises Estatísticas (SAEG), versão 9.1 (2007).

SOGBE, E., HERNADEZ, M., DIAZ, C. T., ASCANIO, E., PUCHE, S. Histological characterization of the reproductive tract as puberty and sexual maturity indicator in

gilts. **Revista Científica, Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade del Zulia**, v.11, n.3, p.219-229, 2001.

SOKOLOWSKI J.H., VANRAVENSWAAY F. Effects of melengestrol acetate on reproduction in the Beagle bitch. **American Journal of Veterinary Research**, v.8, n. 37, p. 943-945, 1976.

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

SPENCER, T.E., BARTOL, F.F., WILEY, A.A., COLEMAN, D.A., WOLFE, D.F. Neonatal porcine endometrial development involves coordinated changes in DNA synthesis, glycosaminoglycan distribution, and 3H-glucosamine labeling. **Biololgy of Reproduction**, v. 46, p.729–740, 1993.

STEWART, C. A., FISHER, S. J., WANG, Y., STEWART, M. D., HEWITT, S. C., RODRIGUEZ, K. F., KORACH, K. S., BEHRINGER, R. R. Uterine gland formation in mice is a continuous process, requiring the ovary after puberty, but not after parturition. **Biology of Reproduction**, v.85, p. 954–964, 2011.

TARLETON, B.J., WILEY, A.A., SPENCER, T.E., MOSS, A.G., BARTOL, F.F. Ovary-independent estrogen receptor expression in neonatal porcine endometrium. **Biololgy of Reproduction**, v.58, p.1009–1019, 1998.

TAYLOR, K. M., GRAY C. A., JOYCE, M. M., STEWART, M. D., BAZER, F. W., SPENCER, T. E. Neonatal ovine uterine development involves alterations in expression of receptors for estrogen, progesterone, and prolactin. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1192–1204, 2000.

WEISS, R.R., CALOMENO, M.A., SOUSA, R.S., BRIERSDORF S.M., CALOMENO, R.A., MURADÁS, P. Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 81-87, 2004.

YIN, Y., MA, L. Development of the mammalian female reproductive tract. **Journal of Biochemical**, v. 137, n. 6, p. 677–683, 2005.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Com os resultados do presente estudo pode-se concluir que:

- O útero da cadela ao nascimento apresenta-se desprovido de glândulas endometriais;
- Cadelas com 15 dias pós-nascimento apresentam glândulas endometriais rudimentares no útero;
- O desenvolvimento das estruturas uterinas (endométrio, miométrio, perimétrio e glândulas endometriais) apresenta-se como um processo contínuo do nascimento até os 180 dias de vida na cadela;
- O útero da cadela apresenta sua conformação e histoarquitetura com características de um animal adulto após 60 dias do nascimento.

5. REFERÊNCIAS

ALLEN, W. R., ERSTENBERG, C. Development of equine endometrial glands from fetal life to ovarian cyclicity. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 56, p. 317 – 326, 2000.

ALTMAN, J. Gonadal hormones humour the brain. **Neuroendocrinology**, v. 79, n.6, p. 287- 95, 2004.

ATKINSON, B.A., KING, G.J., AMOROSO, E.C. Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. **Biololy of Reproduction**, v.30, p.763–764, 1984.

AUGSBURGER, R.H., KURZI, M. Histomorphologic and morphometric evaluation of the uterine horns in nulliparous and multiparous beagles. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 5, p. 552-558, 2004.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992. 629p.

BARRAU, M.D., ABEL, J. H, TORBIT, C.A., TIETZ, W.J. Development of the implantation champer in pregnancy bitch. **American Journal of Anatomy**, v.143, p.115-130, 1975.

BARTOL F. F., WILEY, A. A., COLEMAN, D. A., WOLFE, D. F., RIDDEL, M.G. Ovine uterine morphogenesis: Effects of age and progestin administration and withdrawal on neonatal endometrial development and DNA synthesis. **Journal of Animal Science**, v.66, p.3000–3009, 1988.

BARTOL, F. F., WILEY, A. A., GOODLETT, D. R. Ovine uterine morphogenesis: Histochemical aspects of endometrial development in the fetus and neonate. **Journal of Animal Science**, v.66, p.1303–1313, 1988.

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 Supplement**, v.48, p.99–116, 1993.

BARTOL, F.F., WILEY, A.A., FLOYD, J.G., OTT, T.L., BAZER, F.W., GRAY, C.A., SPENCER, T.E. Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 54, p.287–302, 1999.

BAZER, F. W., ROBERTS, R. M., THATCHER, W. W. Actions of hormones on the uterus and effect of conceptus development. **Journal of Animal Science Supplement**, v. 49 (Suppl. 2), p. 35–45, 1979.

BICKNELL, R. Steroids and the endometrium. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 543-560, 2000.

BRANHAM, W. S., SHEEHAN, D.M., ZEHR, D. R., MEDLOCK, K. L., NELSON, C.J, RIDLON, E. Inhibition of rat uterine gland genesis by tamoxifen. **Endocrinology**, v. 117, p. 2238–2248, 1985.

BRANHAM, W.S., SHEEHAN, D.M. Ovarian and adrenal contributions to postnatal growth and differentiation of the rat uterus. **Biology of Reproduction**, v.53, p.863–872, 1995.

BRODY, J.R., CUNHA, G.R. Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: I. Normal development. **American Journal of Anatomy**, v.186, p.1–20, 1989.

CARPENTER, K. D., GRAY, C. A., NOEL, S., BAZER, F. W., GERTLER, A., SPENCER, T. E. Prolactin regulation of neonatal ovine uterine gland morphogenesis. **Endocrinology** v.144, p. 110–120 2003.

CARPENTER, K. D., HAYASHI K., SPENCER, T. E. Ovarian regulation of endometrial gland morphogenesis and activin/follistatin system in the neonatal ovine uterus. **Biology of Reproduction**, V.69, p.851–860, 2003.

CARREIRA, P.R., PIRES, M. A. Hiperplasia cística do endométrio em cadelas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**. v. 56, p. 5-16, 2005.

CARSON, D. D., BAGCHI, I., DEY, S. K., ENDERS, A. C. , FAZLEABAS, A. T., LESSEY, B. A., YOSHINAGA, K. Embryo implantation. **Developmental Biology**, v. 223, p. 217–237, 2000.

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.

CHRISTENSON, R.K., BARTOL, F.F., VALLET, J.L., WILEY, A.A., SPENCER, T.E. Comparative study of uterine morphogenesis and protein secretion in neonatal White crossbred and Meishan gilts. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1112– 1129, 1997.

CONCANNON, P. W., IAMAN, L., FRANK, D. A., MICHEL, F.J., CURRIE, W. B. Elevated concentrations of 13,14-dihydro-15- keto-prostaglandin F-2 in maternal plasma during prepartum luteolysis and parturition in dogs (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.84, p.71-77, 1988.

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

CUNHA, G. R., CHUNG, L. W. K., SHANNON, J. M., TAGUCHI, O., FUJII, H. Hormone-induced morphogenesis and growth: Role of mesenchymal-epithelial interactions. **Hormone Research** v. 39, p.559–595, 1983.

DANTZER, V., LEISER, R. Placentation. In: DIETERDELLMANN, H., EURELL, J. **Textbook of Veterinary Histology**. 5th ed. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins, 1998. cap. 14, p. 270-86.

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

DE COCK, H., DUCATELLE, R., LOGGHE, J. P. Immunohistochemical localization of estrogen receptors in the normal canine female genital tract. **Domestic Animal Endocrinology**, v.14, n. 3, p. 133-147, 1997.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Veterinary Record**, v.69, p.1409-1415, 1957.

ELLENPORT C. R. Aparelho urogenital geral . In GETTY, R. **Anatomia dos Animais Domésticos**, 5^a ed., Rio de Janeiro: Interamericana, 1981. 2v. 1996.

ENGLAND, G. C., BURGESS, C. M., FREEMAN, S. L., SMITH, S. C., PACEY, A. A. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. **Theriogenology**, v.6, p.1410-1418, 2006.

ERICES, J., SCHNURRBUSCH, U. Uterus development in swine from birth to 8 months of age. **Archive fur Experimentelle Veterinarmedizin**, v.33, n.3, p.457-473, 1979.

FAHMY, M. H. Prolific Sheep. CAB International, Wallingford, Oxon, U. K. GETTY, R. **Anatomia dos Animais Domésticos**, 5^a ed., Rio de Janeiro: Interamericana, 1981. 2v. 1996.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Periparturient diseases. In: **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W.B.Saunders, 1996. Cap.19, p.586.

GALABOVA G., EGERBACHER M., AURICH J. E., LEITNER M., WALTER I. Morphological changes of the endometrial epithelium in the bitch during metoestrus and anoestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 5, p. 415-20, 2003.

GONZÁLEZ, F.H.D. Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária. Porto Alegre, 2002. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/favet/bioquimica/posgrand/>.

GRAY, C. A., BARTOL, F. F., TAYLOR, K. M., WILEY, A. A., RAMSEY, W. S., OTT, T. L., BAZER, F. W., SPENCER, T. E. Ovine uterine gland knock-out model: Effects of gland ablation on the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.62, p.448–456, 2000.

GRAY, C.A., BURGHARDT, R.C., JOHNSON, G.A., BAZER, F.W., SPENCER, T.E. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. **Reproduction**, v. 124, p. 289-300, 2002.

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.

GRUNERT, E., BIRGEL, E. H. **Obstetrícia Veterinária**. ed. Porto Alegre: Sulina, 1989. 336p.

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

HAYASHI, K., YOSHIOKA, S., REARDON, S. N., RUCKER, E. B., SPENCER, T. E., DE MAYO, F. J., LYDON, J. P., MACLEAN, J. A. WNTs in the neonatal mouse uterus: potential regulation of endometrial gland development. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 308–319, 2011.

HAYASHI, K., CARPENTER, K. D., GRAY, C. A., SPENCER, T. E. The activin-follistatin system in the neonatal ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v.69, p.851–860, 2003.

JUNQUEIRA, L.C.U. Histology revisited – Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. **Ciência Cultura**, v.47, p.92-95, 1995.

KENNEDY, J. P., WORTHINGTON, C. A., COLE, E. R. The postnatal development of the ovary and uterus of the merino lamb. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 36, p.275–282, 1974.

LUZ, M. R., BERTAN, C. M., BINELLI, M., LOPES, M. D. In vitro PGF₂α production by endometrium and corpus luteum explants from pregnant and nonpregnant diestrus bitches and placental explants from pregnant bitches. **Theriogenology**, v.66, p.1442-7, 2006.

LUZ, M. R., CESÁRIO, M .D., BINELLI, M., LOPES, M. Canine corpus luteum regression: apoptosis and caspase-3 activity. **Theriogenology**, v. 66, p. 1448-1453, 2006.

LYDON, J. P., DEMAYO, F.J., FUNK, C. R., MANI, S. K., HUGHES, A. R., MONTGOMERY, C. A . JR, SHYAMALA, G., CONNEELY, O. M., O'MALLEY, B. W. Mice lacking progesterone receptors exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. **Genes and Development** , v. 9, p. 2266–2278, 1995.

MARION, G.B., GIER, H.T. Ovarian and uterine embryogenesis and morphology of the nonpregnant female mammal. **Journal of Animal Science Supplement**, v.32 (suppl 1), p.24–47, 1971.

MCKEEHAN, W.L., WANG, F., KAN, M. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog Nucleic Acid. Research in Molecular Biology*, v.59, p.135–176, 1998.

MONTEIRO, C.M.R., PERRI, S.H.V., CARVALHO, R.C., KOIVISTO, M.B. Histologia e morfometria em cornos uterinos de cadelas nulíparas, múltiparas e tratadas com contraceptivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.847-851, 2009.

MONTEIRO, C. M. R., CARVALHO, R. C. Caracterização histológica do útero, tubas uterinas e ovários de fêmeas recém-nascidas, pré-púberes e púberes de suínos mestiços (*Sus scrofa domestica* – L. 1758). **ARS Veterinaria**, v. 22, n. 3, p. 223-228, 2006.

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

OKULICZ, W. C., ACE, C. I., SCARRELL, R. Zonal changes in proliferation in the rhesus endometrium during the late secretory phase and menses. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 214, p.132–138, 1997.

PRIEDKLNS, J., LEISER, R. Female Reproductive System. In: DELLMANN, H.D.; EURELL, J. **Textbook of Veterinary Histology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. p. 247-286.

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 (Part B)**, v. 80, p. 233-245, 2007.

REYNAULD, K., FONTBONNE, A., MARSELOO, N., THOUMIRE, S., CHEBROUT, M., VIARIS DE LESEGNO, C., CHASTANT-MAILLARD, S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**, v.130, p.193-201, 2005.

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.

SATO, T., WANG, G., HARDY, M. P., KURITA, T., CUNHA, G. R., COOKE, P. S. Role of systemic and local IGF-I in the effects of estrogen on growth and epithelial proliferation of mouse uterus. **Endocrinology**, v.143, p.2673–2679, 2002.

Sistema para Análises Estatísticas (SAEG), versão 9.1 (2007).

SOGBE, E., HERNANDEZ, M., DIAZ, C. T., ASCANIO, E., PUCHE, S. Histological characterization of the reproductive tract as puberty and sexual maturity indicator in gilts. **Revista Científica, Facultad de Ciências Veterinarias, Universidad del Zulia**, v.11, n.3, p.219-229, 2001.

SOKOLOWSKI J.H. & VANRAVENSWAAY F. Effects of melengestrol acetate on reproduction in the Beagle bitch. **American Journal of Veterinary Research**, v.8, n. 37, p. 943-945, 1976.

SPENCER T. E., WILEY, A. A., BARTOL, F. F. Neonatal age and period of estrogen exposure affect porcine uterine growth, morphogenesis, and protein synthesis. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 741–751, 1993.

SPENCER, T. E., STAGG, A. G., JOYCE, M. M., JENSTER, G, WOOD C. G., BAZER, F. W., WILEY, A. A., BARTOL, F. F. Discovery and characterization of

endometrial epithelial messenger ribonucleic acids using the ovine uterine gland knockout model. **Endocrinology**, v. 140, p. 4070–4080, 1999.

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.

SPENCER, T.E., BARTOL, F.F., WILEY, A.A., COLEMAN, D.A., WOLFE, D.F. Neonatal porcine endometrial development involves coordinated changes in DNA synthesis, glycosaminoglycan distribution, and 3H-glucosamine labeling. **Biology of Reproduction**, v. 46, p.729–740, 1993.

SPENCER, T.E., BARTOL, F.F., WILEY, A.A., COLEMAN, D.A., WOLFE, D.F. Neonatal porcine endometrial development involves coordinated changes in DNA synthesis, glycosaminoglycan distribution, and 3H-glucosamine labeling. **Biology of Reproduction**, v. 46, p.729–740, 1993.

STEWART, C. A., FISHER, S. J., WANG, Y., STEWART, M. D., HEWITT, S. C., RODRIGUEZ, K. F., KORACH, K. S., BEHRINGER, R. R. Uterine gland formation in mice is a continuous process, requiring the ovary after puberty, but not after parturition. **Biology of Reproduction**, v.85, p. 954–964, 2011.

TARLETON, B. J., WILEY, A. A., SPENCER, T. E., MOSS, A. G., BARTOL, F. F. Ovary-independent estrogen receptor expression in neonatal porcine endometrium. **Biology of Reproduction**, v.58, p.1009–1019, 1998.

TAYLOR, K. M., CHEN, C., GRAY, C. A., BAZER, F. W., SPENCER, T. E. Expression of mRNAs for fibroblast growth factors 7 and 10, hepatocyte growth

factor and insulin-like growth factors and their receptors in the neonatal ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1236–1246, 2001.

TAYLOR, K. M., GRAY, C. A., JOYCE, M. M., STEWART, M. D., BAZER, F. W., SPENCER, T. E. Neonatal ovine uterine development involves alterations in expression of receptors for estrogen, progesterone, and prolactin. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1192–1204, 2000.

VALDES-DAPENA, M. A. The development of the uterus in late fetal life, infancy, and childhood. In: Norris HJ, Hertig AT, Abell MR (eds.), **The Uterus**. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1973: 40–67.

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.

WEISS, R.R., CALOMENO, M.A., SOUSA, R.S., BRIERSDORF, S.M., CALOMENO, R.A., MURADÁS, P. Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 81-87, 2004.

WILEY, A. A., BARTOL, F. F., BARRON, D. H. Histogenesis of the ovine uterus. **Journal of Animal Science**, v. 64, p.1262–1269, 1987.

YIN, Y., MA, L. Development of the mammalian female reproductive tract. **Journal of Biochemical**, v. 137, N. 6, p. 677–683, 2005.

6. ANEXOS

6.1 - TABELA

Tabela 2 – Equações de regressão das avaliações histomorfométricas do útero de cadelas pré-púberes com idades entre 1 e 180 dias pós-nascimento, com respectivos coeficientes de determinação (R^2) e significância (P).

Variável	Equação de Regressão	Coefficiente (R^2)	Significância
EPU	$\hat{Y} = 189,269 + 6,29236.X - 0,00981712.X^2$	(97,4%)	P < 0,0001
EM	$\hat{Y} = 95,1666 + 6,87754.X - 0,0191789.X^2$	(95,8%)	P < 0,0001
EE	$\hat{Y} = 43,4684 + 0,606810.X + 0,00455978.X^2$	(99,4%)	P < 0,0001
N°GI	$\hat{Y} = - 0,0179917 + 0,116197.X - 0,000285817.X^2$	(92,3%)	P < 0,0001
DGI	$\hat{Y} = - 0,0801541 + 5,27062.X - 0,213790.X^2$	(94,1%)	P < 0,0001
AE	$\hat{Y} = 4,2600 + 0,00639167.X - 0,00000416667.X^2$	(72,2%)	P < 0,0001

EPU = Espessura da parede uterina (μm); EM = Espessura do miométrio (μm); EE= Espessura do endométrio (μm); N°GI= Número de glândulas endometriais; DGI= Diâmetro das glândulas endometriais (μm); AE = Altura do Epitélio (μm).

6.2 - GRÁFICOS

Gráfico 1 – Diagrama de dispersão da espessura da parede uterina total (μm) pela idade das cadelas. Representação da equação de regressão ajustada e do coeficiente de determinação (R^2).

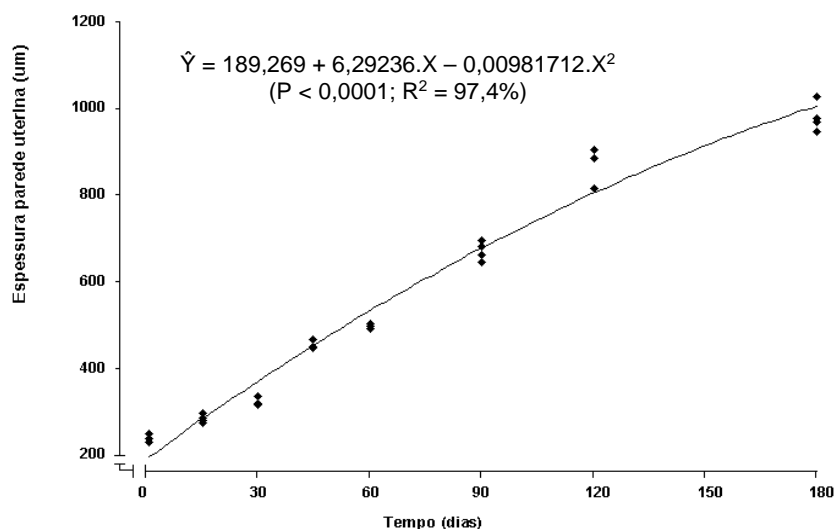


Gráfico 2 – Diagrama de dispersão da espessura do miométrio (μm) pela idade das cadelas. Representação da equação de regressão ajustada e do coeficiente de determinação (R^2).

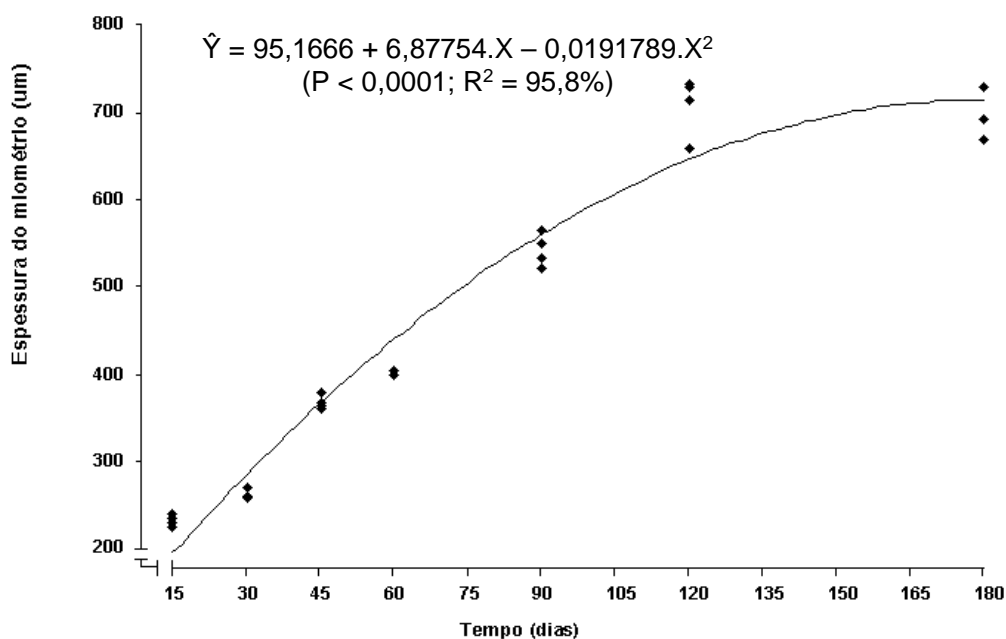


Gráfico 3 – Diagrama de dispersão da espessura do endométrio (μm) pela idade das cadelas. Representação da equação de regressão ajustada e do coeficiente de determinação (R^2).

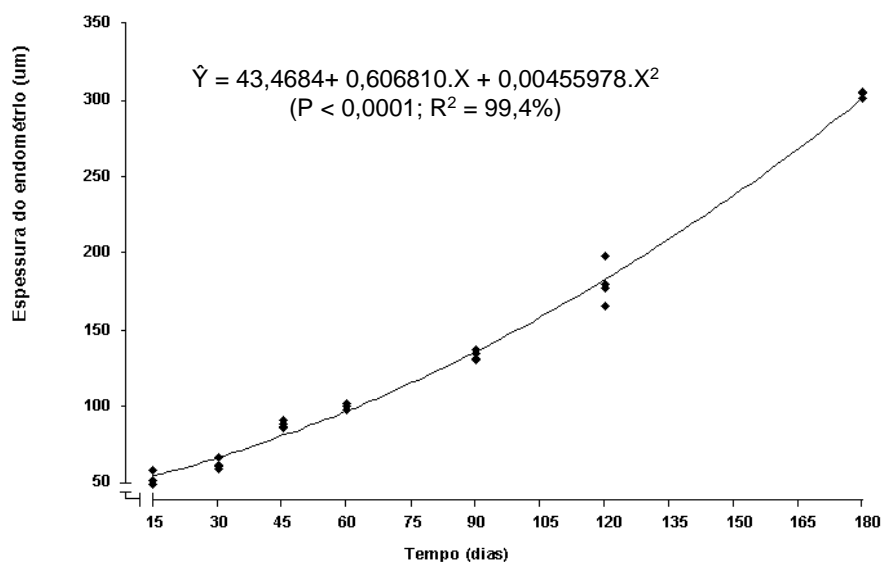


Gráfico 4 – Diagrama de dispersão do número de glândulas endometriais/ mm^2 pela idade das cadelas. Representação da equação de regressão ajustada e do coeficiente de determinação (R^2).

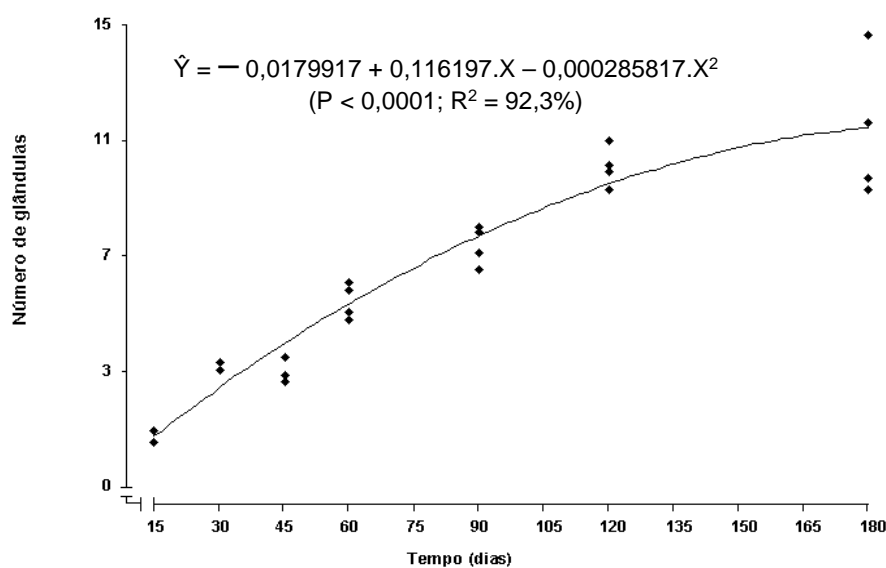


Gráfico 5 – Diagrama de dispersão do diâmetro das glândulas endometriais (μm) pela idade das cadelas. Representação da equação de regressão ajustada e do coeficiente de determinação (R^2).

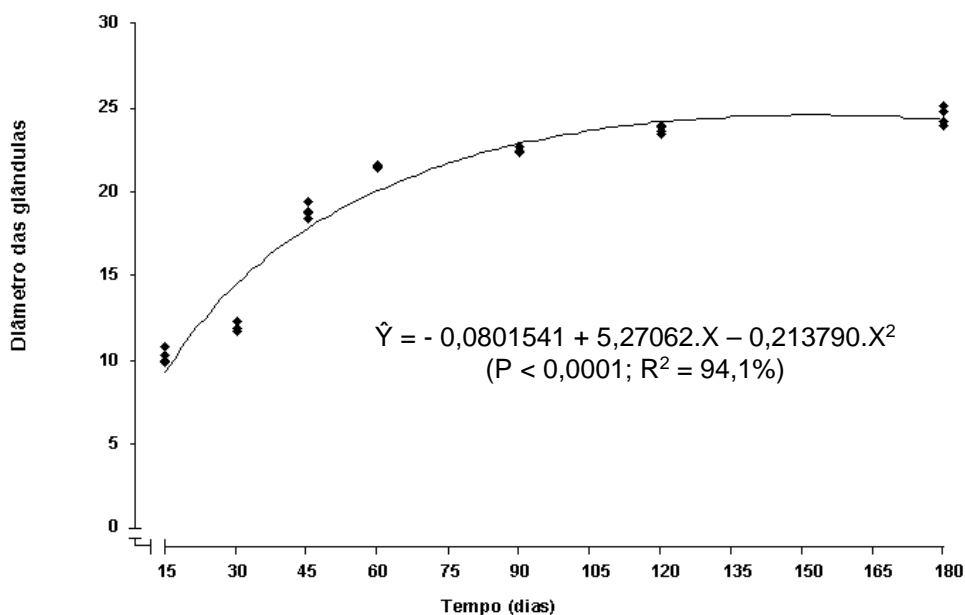
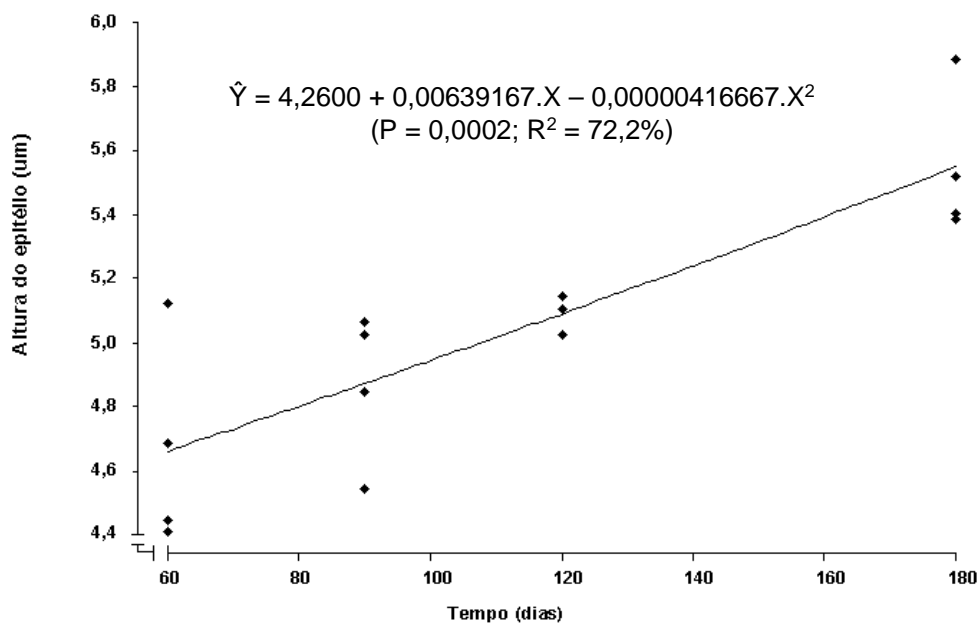


Gráfico 6 – Diagrama de dispersão da altura do epitélio (μm) pela idade das cadelas. Representação da equação de regressão ajustada e do coeficiente de determinação (R^2).



6.3 – FIGURAS

ADENOGENESE

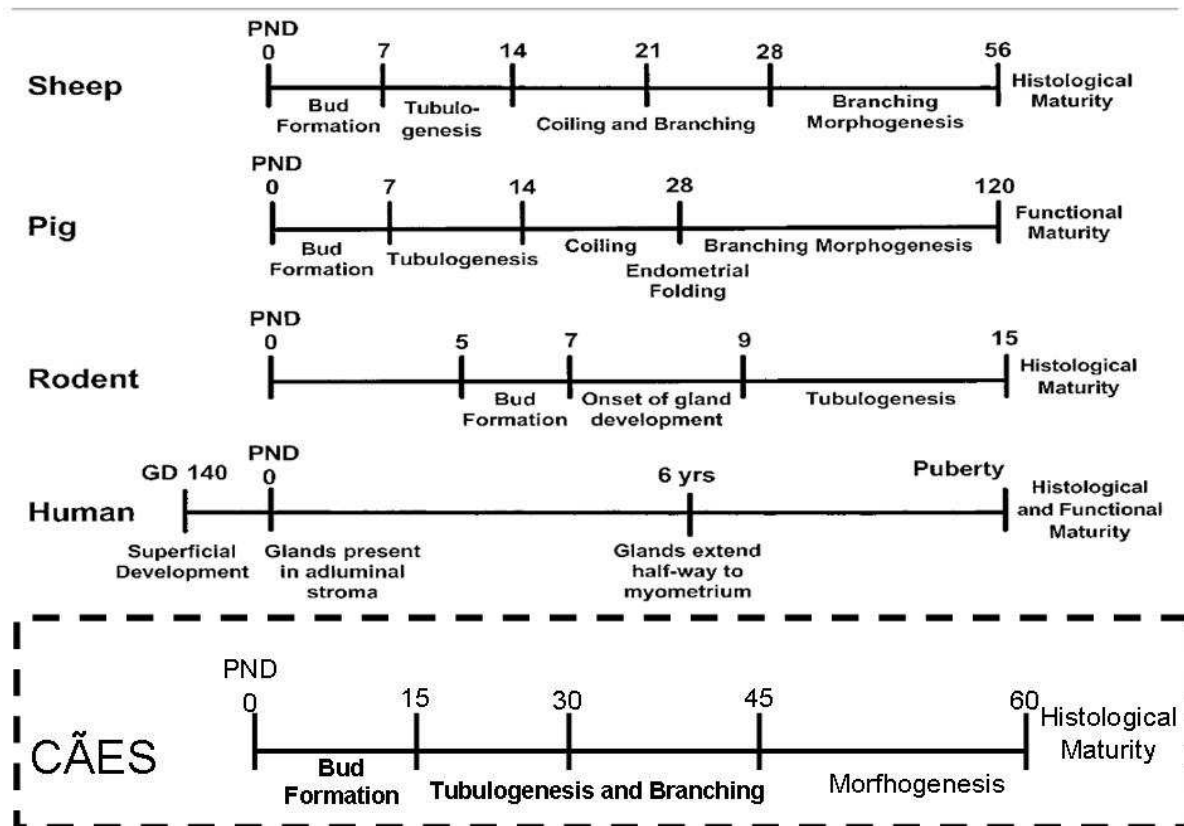


Figura 2. – Esquema proposto do desenvolvimento das glândulas endometriais (adenogênese) em cães comparativamente com outras espécies. PND = Dias pós nascimento.