

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

NATÁLIA SOARES TEIXEIRA

**EFEITO DO ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS GLÂNDULAS
ENDOMETRIAIS
EM CADELAS: AVALIAÇÕES HISTOLÓGICA E
IMUNOISTOQUÍMICA**

ALEGRE – ES

2013

NATÁLIA SOARES TEIXEIRA

**EFEITO DO ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS GLÂNDULAS
ENDOMETRIAIS
EM CADELAS: AVALIAÇÕES HISTOLÓGICA E
IMUNOISTOQUÍMICA**

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

NATÁLIA SOARES TEIXEIRA

**EFEITO DO ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS GLÂNDULAS
ENDOMETRIAIS
EM CADELAS: AVALIAÇÕES HISTOLÓGICA E
IMUNOISTOQUÍMICA**

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 01 de fevereiro de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof^a. Dr^a. Jeanne Broch Siqueira
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Mariana Machado Neves
Universidade Federal de Viçosa

Aos meus pais, Maria de Fátima e Ítalo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por jamais ter deixado me faltar vontade e entusiasmo para seguir em frente e concretizar mais uma etapa de minha vida, mesmo com todas as dificuldades encontradas.

Aos animais, que mesmo sem perceber contribuíram tanto para a formação da pessoa que sou hoje, me ensinando a amar a cima de tudo.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, dedicação, amor e ensinamentos dos valores fundamentais da vida, que estarei sempre levando comigo.

Ao meu amado Kelvinson, pelo apoio, amor, paciência, dedicação e companheirismo. Sem você tudo seria muito mais difícil e doloroso.

Aos meus irmãos, Marcelo e Carolina, pelo carinho e amizade.

A todos os meus familiares.

Ao meu orientador Marcelo Rezende Luz, pelo voto de confiança que proporcionou o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado!

Aos meus companheiros de curso, Bianca Barcelos Martins e José Leonardo Gualberto Ramos, pela colaboração nos experimentos.

Às minhas irmãs de república, Lívia, Edlayne, Jéssica, Juliana, Milena e Cíntia pela amizade, paciência e importantíssimos momentos de descontração.

Aos amigos sempre presentes em meu coração e pensamento, Vinícius, Antônio, Lourenço, Jésus, Clóvis, Suelen, Jamili, Stela e Pollyanna Zampirolli. Muito obrigada!

“É exatamente disso que a vida é feita: De momentos! Momentos os quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso próprio aprendizado, por algum motivo. Nunca esquecendo do mais importante: Nada na vida é por acaso...”

Francisco Cândido Xavier.

RESUMO

Cadelas com útero desprovido de glândulas endometriais, fenótipo denominado “*uterine gland-knockout*” (UGKO), seriam animais estéreis, e poderiam contribuir para o controle populacional da espécie. Como a exposição inadequada do sistema reprodutor feminino a esteróides durante períodos críticos do desenvolvimento uterino pode levar a formação deste fenótipo, como observado em vacas, ovelhas e ratas, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito de aplicações seriadas (do nascimento aos 6 meses de idade) de acetato de medroxiprogesterona sobre o desenvolvimento de glândulas endometriais em cadelas. Dezesesseis fêmeas, sem raça definida, de ninhadas diferentes, foram 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 à 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, foi realizada ovariectomia em todos os animais, e amostras dos cornos uterinos foram coletadas e fixadas para exames histológico e imunohistoquímica. Foram mensuradas a espessura total (μm) da parede uterina, endométrio (μm); miométrio (μm), diâmetro das glândulas endometriais (μm), número de glândulas endometriais/ mm^2 , altura do epitélio (μm) e a expressão dos receptores de ER- α , ER- β e PR no epitélio superficial e estroma endometrial. As cadelas do grupo MPA apresentaram redução de 35% no número de glândulas endometriais, além de maior diâmetro das glândulas, maior espessura da parede uterina, do endométrio e miométrio, e altura do epitélio. Não foram observadas diferenças estatísticas entre grupos em relação à expressão dos receptores ER- α , ER- β e PR, tanto no epitélio superficial como no estroma endometrial. Conclui-se que aplicações seriadas de acetato de medroxiprogesterona, do nascimento aos 6 meses de idade, não são capazes de causar ablação total no desenvolvimento de glândulas endometriais em cadelas, mas uma redução de 35% no seu desenvolvimento.

Palavras-chave: glândulas endometriais, acetato de medroxiprogesterona, útero, desenvolvimento, cadela.

ABSTRACT

Bitches with uterus devoid of endometrial glands, phenotype called uterine gland-knockout (UGKO), should be sterile animals, and could contribute to the species overpopulation control. Since the inadequate exposure of the female reproductive system to steroids during critical periods of development can lead to the formation of this phenotype, as observed in cows, sheep and rats, the aim of this study was to evaluate the effect of serial applications (from birth to 6 months old) of medroxyprogesterone acetate on the development of endometrial glands in the bitch. Sixteen cross-bred females, from different litters, were 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 to age of 6 months, and C (n = 8), control females, untreated, that received injections of 0.9% NaCl solution, treated similarly. At age of 6 months, ovariohysterectomy was performed in all animals, and samples of uterine horns were collected and fixed for histologic and immunohistochemical analyzes. We measured the total thickness (μm) from the uterine wall, endometrium (μm); myometrium (μm), diameter of the endometrial glands (μm), number of endometrial glands / mm^2 , epithelial height (μm) and expression of ER- α , ER- β and PR in the surface epithelium and endometrial stroma. Bitches from MPA group showed 35% reduction in the number of endometrial glands, endometrial glands with larger diameter, greater uterine wall, endometrium and myometrium thickness, and the height of the epithelium. There were no statistical differences between groups in relation to the expression of ER- α , ER- β and PR both the surface epithelium and in endometrial stroma. It is concluded that serial applications of medroxyprogesterone acetate, from birth to 6 months old are not able to cause total ablation in the development of endometrial glands in the bitch, but a 35% reduction in its development.

Keywords: endometrial glands, medroxyprogesterone acetate, uterus, development, bitch.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografia do útero de cadelas tratadas MPA (A) ou controle (B). A. Observar presença de pequenas glândulas endometriais (seta preta), estroma glandular (seta azul). B. Observar presença de glândulas endometriais maiores (seta verde), estroma glandular (seta vermelha). _____ 21

Figura 2 - Expressão dos receptores ER- α (A e D), ER- β (B e E) e PR (C e F) no epitélio superficial e estroma endometrial. _____ 22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média e erro-padrão do número de glândulas/mm², diâmetro glândular, espessura de parede uterina, endométrio e miométrio e altura do epitélio em cadelas tratadas com MPA ou controle (C). _____ 20

Tabela 2: Expressão dos receptores PR, ER- α e ER- β , no epitélio superficial e estroma endometrial, em cadelas tratadas com MPA ou controle (C). _____ 22

LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

P ₄ –	Progesterona
E ₂ –	Estradiol
PGF _{2α} –	Prostaglandina F _{2α}
LH –	Hormônio Luteinizante
PR –	Receptor de Progesterona
ER-α –	Receptor de Estrógeno alfa
ER-β –	Receptor de Estrógeno beta
EL –	Epitélio Luminal
EG –	Epitélio Glândular
ECP –	Cipionato de Estradiol
DES –	Dietilestilbestrol
D2 –	Receptor D2
ZP –	Zona Pelúcida
IFN-γ –	Interferon gama
IL –	Interleucina
ICI –	Antagonista de Estrógeno ICI

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Particularidades reprodutivas na cadela	3
2.2 Métodos de contracepção em cadelas	4
2.3 Importância do útero na fertilidade de cadelas	7
2.4 Efeitos da progesterona na inibição do desenvolvimento das glândulas endometriais em neonatos	8
CAPÍTULO 1	12
3 Cap. 1 – Ablação parcial do desenvolvimento das glândulas endometriais em cadelas após exposição a progestágeno no período neonatal	13
3.1 RESUMO	13
3.2 ABSTRACT	14
3.3 INTRODUÇÃO	15
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.4.1 Animais	17
3.4.2 Obtenção de Amostras e Preparação Histológica	17
3.4.3 Avaliação Imunoistoquímica	18
3.4.4 Análise Estatística	19
3.5 RESULTADOS	19
3.5.1 Análise Histológica	19
3.5.2 Imunoistoquímica	21
3.5.3 Alterações Clínicas	23
3.6 DISCUSSÃO	23
3.7 CONCLUSÕES	25
3.8 AGRADECIMENTOS	26
3.9 REFERÊNCIAS	26
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
5. REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

A fisiologia reprodutiva canina é consideravelmente diferente das outras espécies de mamíferos (YASUYUKI et al., 2008). O oócito / embrião canino leva um grande tempo na trompa uterina, em comparação com muitos outros mamíferos domésticos (BETTERIDGE, 1995), além do desenvolvimento embrionário ser lento, bem como o período de pré-implantação total (REYNAUD et al., 2006). Desta maneira, oócitos e embriões caninos passam um longo tempo, aproximadamente 20 dias, soltos no interior do útero antes da implantação (REYNAUD et al., 2006; YASUYUKI et al., 2008).

Na espécie canina, o conhecimento sobre o meio imunológico intra-uterino durante o início da gestação e interações materno-fetais ainda é deficiente (SCHAFER-SOMI et al., 2008). O útero se encontra com uma rica vascularização, apresentando sua mucosa espessada, bem como uma alta atividade glandular devido à ação da progesterona. Também ocorre a produção de substâncias ricas e nutritivas para alimentar o blastocisto, chamadas de histótrofo (FELDMAN; NELSON, 1995).

O histótrofo (leite uterino) é sintetizado, secretado e transportado pelas glândulas endometriais. Estudos comprovam que as glândulas endometriais são de fundamental importância para a sobrevivência do conceito, início de desenvolvimento, bem como dos sinais para a implantação e placentação. Assim sendo, o leite uterino torna-se primordial como fonte de nutrição ao embrião antes da placentação (BAZER, 1975; ROBERTS;BAZER, 1988; CARSON et al., 2000; GRAY et al., 2001).

Em cadelas, as glândulas endometriais delimitam a invasão trofoblástica (AMBRÓSIO et al., 2011). Cadelas idosas apresentam disfunção endometrial e miometrial, devido à hiperplasia endometrial cística que gradualmente transforma o endométrio em um tecido cístico e / ou hiperplásico, o que interfere na vascularização uterina necessária para a implantação embrionária, desenvolvimento e manutenção da gestação (DANILOVICH; SAIRAM, 2006). Portanto, cadelas idosas são predispostas à falha na implantação embrionária, problemas durante a gestação e parto (VOORWALD et al., 2012).

Eventos morfogenéticos para o desenvolvimento uterino de todos os mamíferos baseiam-se em organização e estratificação do estroma endometrial, diferenciação e desenvolvimento do miométrio e o desenvolvimento coordenado das glândulas endometriais (BARTOL et al., 1993). Conseqüentemente, neonatos ovinos, bovinos e suínos surgem como modelos atraentes para estudos dos mecanismos que regulam estes processos (METZEGGER; KRASNOW, 1999).

A exposição inadequada do trato reprodutivo feminino para esteroides durante períodos críticos do desenvolvimento pode atrapalhar os eventos organizacionais necessários para o crescimento e diferenciação, podendo levar a fenótipos adultos alterados e diminuir eficiência reprodutiva (GRAY et al., 2000). Em suínos recém-nascidos a exposição inadequada a valerato de estradiol não afetou a taxa de ovulação, mas reduziu a sobrevivência embrionária quando adultas (BARTOL et al., 1993).

Na espécie bovina, bezerras recém-nascidas expostas a implantes de progesterona e benzoato de estradiol apresentaram redução do peso úmido uterocervical, área miometrial e glândulas endometriais, sugerindo efeitos profundos sobre a morfologia uterina do gado adulto (BARTOL et al., 1995).

Em ovinos, a exposição crônica à progesterona sintética desde o nascimento até à puberdade causa a ablação total das glândulas endometriais, exibindo um perfil “*knockout*” para glândula uterina em ovelhas adultas (*uterine gland-knockout - UGKO*) (BARTOL et al., 1997).

Com o presente estudo objetivou-se avaliar o efeito de aplicações seriadas (do nascimento aos 6 meses de idade) de acetato de medroxiprogesterona sobre o desenvolvimento de glândulas endometriais em cadelas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Particularidades reprodutivas na cadela

A fisiologia reprodutiva canina é consideravelmente diferente das outras espécies de mamíferos. A cadela é uma espécie monoéstrica, poliovulatória, predominantemente não sazonal. A concentração plasmática de progesterona (P₄) começa a aumentar alguns dias antes da ovulação, em face da luteinização folicular pré-ovulatória, característica da espécie. Os ovócitos caninos são ovulados em estágio de vesícula germinativa, e completam sua maturação nos ovidutos (YASUYUKI et al., 2008). O aumento abrupto da concentração plasmática de P₄ no início do processo de luteinização é essencial para a indução do aumento plasmático de hormônio luteinizante (LH). Irregularidades no aumento repentino de LH e ovulação podem ocorrer como resultado de luteinização antecipada anormal, o que pode resultar em condições clínicas, tais como falso estro, anovulação, ovulação prolongada e infertilidade. Estas condições são relativamente comuns em cadelas mais velhas (VERSTEGEN-ONCLIN; VERSTEGEN, 2008).

Outras particularidades da espécie incluem atraso na implantação do embrião, concentração plasmática de P₄ aparentemente similar em animais gestantes e não-gestantes (embora o metabolismo da progesterona seja significativamente aumentado nas gestantes) e a produção exclusiva de progesterona pelos corpos lúteos e da relaxina pela placenta (GUDERMUTH et al., 1998; ONCLIN et al., 1997; LUZ et al., 2006).

O embrião canino permanece um grande período de tempo (8-10 dias) nos ovidutos em comparação com muitos outros mamíferos domésticos. Por exemplo, embriões de suínos permanecem 2 dias e de bovinos e camundongos, 3-4 dias (BETTERIDGE, 1995). Além disso, o desenvolvimento embrionário canino é lento, bem como o período de pré-implantação total (18-20 dias) (REYNAUD et al., 2006). Devido a estas características reprodutivas singulares, a situação real e mecanismos de desenvolvimento precoce, tais como maturação ovocitária, fertilização e embriogênese não foram completamente elucidados na espécie canina (REYNAUD et al., 2006; YASUYUKI et al., 2008).

Em muitas espécies, fatores que contribuem para o reconhecimento materno e manutenção de gestação são bem conhecidos, substancialmente em medicina preventiva humana. No entanto, na espécie canina, o conhecimento sobre o meio imunológico intra-uterino no início da gestação, bem como as interações materno-fetais ainda é deficiente. Entretanto, sabe-se que células uterinas de cadelas secretam citocinas como interferon- γ (IFN- γ), interleucina-4 (IL-4) e interleucina-8 (IL-8), havendo homologia ao que é secretado e pelo útero humano para haver adesão, implantação, crescimento e desenvolvimento embrionário adequado (SCHAFER-SOMI et al., 2008). Além disso, o útero se encontra ricamente vascularizado, apresentando mucosa espessada, bem como uma alta atividade glandular devido a ação da progesterona. Neste contexto, está ocorrendo também a produção de substâncias ricas em nutrientes para alimentar o embrião, o chamado “leite uterino” ou histótrofo (FELDMAN; NELSON, 1995), no período anterior a formação das placentas.

2.2 Métodos de contracepção em cadelas

A superpopulação de cães é um desafio para a saúde pública e o bem-estar animal. Tal descontrole da população de cães é algo que representa um problema nos centros urbanos. Os cães podem agir como reservatórios de doenças, algumas de caráter zoonótico, causando riscos à saúde pública e causar incômodos variados, como acidentes de trânsito e acúmulo de dejetos, entre outros. Desta forma, a utilização de métodos contraceptivos é importante no controle dessa população (DE PAULA, 2010). Entre os métodos contraceptivos mais utilizados estão a ováriosalpingohisterectomia (OSH) e os tratamentos hormonais (WEISS et al., 2004).

A técnica de OSH é eficaz e permanente, porém necessita de profissionais treinados, a fim de diminuir riscos como hemorragias, ligadura accidental ou trauma do ureter promovendo hidronefrose e hidroureter, incontinência urinária responsiva a baixa concentração de estrógeno pós-OSH, formação de trajetos fistulosos e granulomas, síndrome do ovário remanescente, problemas relacionados à

celiotomia, piometra de coto, obstruções intestinais (HOWE, 2006; SANTOS et al., 2009).

Ao longo das últimas três décadas aumentaram dramaticamente os estudos referentes à biologia reprodutiva das cadelas, havendo conseqüentemente maior disponibilidade de agentes farmacológicos para manipulação do ciclo estral. Neste contexto, progestágenos (acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, proligestona), estrógenos (cipionato de estradiol, benzoato de estradiol), inibidores da prolactina (bromocriptina, metergolina e cabergolina), e também antagonistas dos receptores de progesterona ou anti-progestágenos (aglepristone, mifepristone) tornaram-se disponíveis, provando serem úteis para o controle hormonal da reprodução na espécie (VERSTEGEN; ENGLAND, 1999).

Todavia, o uso de progestágenos e estrógenos podem acarretar diversos efeitos adversos. No caso dos progestágenos, pode ocorrer aumento de apetite e obesidade, letargia, neoplasias mamárias, diabetes insipidus e supressão da adrenal, aumento da concentração plasmática do hormônio do crescimento (GH), alterações acromegálicas e reações cutâneas no local da aplicação (SELMAN et al., 1995; GOBELLO et al., 2003; FELDMAN; NELSON, 2004; KUTZLER; WOOD, 2006). Os estrógenos, normalmente usados para prevenir/interromper a gestação, aumentam significativamente o risco de o animal desenvolver piometra, anemia aplásica irreversível de medula óssea e estro prolongado (BOWEN et al., 1985).

Os inibidores da prolactina são alcalóides derivados do ergot que exercem um efeito anti-prolactínico via estimulação de receptores D2 da pituitária ou inibição de centros serotoninérgicos. Sua principal indicação é a supressão da lactação, porém também são usados com sucesso para a interrupção da gestação e encurtamento de intervalos inter-estros (GOBELLO, 2006).

Os agentes anti-progestágenos são bastante eficazes como contraceptivos e não têm efeitos colaterais graves. Parecem não afetar a fertilidade em longo prazo, possuem efeito de início rápido, e podem ser usados como medicamento ambulatorial (FIENI et al., 1996). Infelizmente possuem alto custo, mas mesmo assim podem ser considerados como tratamento contraceptivo de escolha.

Outros agentes capazes de auxiliar no controle hormonal da reprodução são as prostaglandinas (PGF_{2α}). Em fêmeas gestantes, prostaglandinas do grupo F,

naturais ou sintéticas, quando administradas causam lise dos corpos lúteos, provocando a interrupção da gestação. Porém a utilização deste agente pode provocar efeitos colaterais significativos como vômitos, diarreia, e, se aplicada em overdose, colapso circulatório. A administração da $PGF_{2\alpha}$ deve ser feita por um período significativo de tempo (> 7-9 dias), e a hospitalização é indicada, aumentando o custo do tratamento. Prostaglandinas sintéticas (cloprostenol, fluprostenol) causam menos efeitos colaterais e são utilizadas por um período de tratamento mais curto, sendo assim preferidas em relação às prostaglandinas naturais (dinoprost) (WIEBE; HOWARD, 2008).

A dexametasona, um corticosteróide, é preconizada por uma pesquisadora da Argentina (Profa. Magdalena Wanke) para interrupção da gestação devido à sua eficácia, poucos efeitos colaterais, baixo custo, disponibilidade e facilidade de administração, torna-se muitas vezes o agente de escolha. Está indicada para cadelas com menos de 40 dias de gestação, as quais geralmente apresentam apenas efeitos colaterais leves, como sangramento vaginal leve, anorexia, polidipsia e poliúria (WANKE et al., 1997).

Da mesma forma, a imun contracepção emergiu como um promissor método contraceptivo. Neste sistema, efeitos colaterais adversos tendem a ser destituídos. Basicamente, este método consiste da ligação de anticorpos a moléculas bioativas do sistema reprodutor responsáveis por interações fundamentais ao processo reprodutivo, que, desta forma, é interrompido (BROWN et al., 1997; JEWGENOW et al., 2006). Assim, a ligação de anticorpos à superfície da zona pelúcida (ZP) de ovócitos torna estes inacessíveis a espermatozóides, impedindo, assim, as interações moleculares necessárias ao processo de fertilização (RINGLEB et al., 2004). O efeito contraceptivo é reversível, mantendo-se até que os títulos dos anticorpos específicos, que gradativamente vão decaindo a níveis abaixo de um limiar contraceptivo, tornem-se insuficientes para o bloqueio da reprodução (LOPES et al., 2008). Em alguns casos, pode ocorrer destruição de elementos não regeneráveis do sistema reprodutivo, devido aos anticorpos produzidos e/ou células citotóxicas do sistema imunológico ativadas nas vacinações (imunização ativa). Outro motivo pelo qual essa técnica ainda não é muito utilizada é a de que em populações com grande diversidade genética, pode ocorrer indivíduos que não

tenham capacidade de resposta imunológica a determinados antígenos, resultando em redução da eficácia do método de vacinação (LOPES et al., 2005).

Em face aos efeitos colaterais dos tratamentos hormonais, dos custos e riscos da esterilização cirúrgica, bem como da possível ineficiência como método para controle populacional em massa, do alto custo dos agentes anti-progestágenos, por exemplo, pesquisas são necessárias para o desenvolvimento de novos métodos contraceptivos, que sejam baratos, eficazes, e sem riscos a saúde do animal.

2.3 Importância do útero na fertilidade de cadelas

O útero de todos os mamíferos contém glândulas endometriais que sintetizam histótrofo. O histótrofo é uma mistura complexa de muitas enzimas, citocinas, fatores de crescimento, íons, hormônios, glicose, de proteínas de transporte, e moléculas de adesão (PERRY; CROMBIE, 1982; GERSTENBERG; ALLEN, 1999; STEWART et al., 2000). Assim, estudos já comprovaram que as glândulas endometriais são de fundamental importância para a sobrevivência do conceito, início de seu desenvolvimento, bem como na implantação e placentação. Neste contexto, o histótrofo torna-se primordial como fonte de nutrição ao embrião antes da placentação (BAZER, 1975; ROBERTS; BAZER, 1988; CARSON et al., 2000; GRAY et al., 2001). De fato, esta questão já havia sido discutida desde o século III a.C. por Aristóteles e posteriormente no século XVII por William Harvey, sugerindo que as glândulas endometriais agiriam como reguladores primários de sobrevivência do embrião (GRAY et al., 2001).

Especificamente na espécie canina, as glândulas endometriais delimitam a invasão trofoblástica. Neste sentido, é enfatizada a extrema importância da rede microvascular e da organização estrutural das glândulas endometriais no início de gestação para tornar possível a confirmação da gestação na espécie canina (AMBRÓSIO et al., 2011). O retinol também tem sido relacionado a um número de funções importantes durante a gestação inicial, como diferenciação celular, proliferação e modulação de fatores de crescimento, transcrição genética, integridade das células epiteliais, hematopoiese, morfogênese, bem como função imune (AMATRUDA; KOEFFLER, 1986).

Cadelas idosas apresentam disfunção endometrial e miometrial devido à hiperplasia endometrial cística, a qual transforma o endométrio sadio em um tecido cístico e / ou hiperplásico, que interfere na vascularização uterina necessária para a implantação embrionária, desenvolvimento e manutenção da gestação (DANILOVICH; SAIRAM, 2006). A integridade da rede microvascular e da organização estrutural das glândulas endometriais são importantes no início da gestação para a interação blastocisto-útero, bem como no decorrer da gestação (SCHLAFER; GIFFORD, 2008; AMBRÓSIO et al., 2011). Neste sentido, cadelas idosas são predispostas à falha na implantação embrionária e problemas durante a gestação (VOORWALD et al., 2012).

2.4 Efeitos da progesterona na inibição do desenvolvimento das glândulas endometriais em neonatos

Em todos os mamíferos, o útero se desenvolve como uma especialização dos ductos paramesonéfricos ou de Müller, o que dá origem ao infundíbulo, ovidutos, útero e vagina anterior. A parede uterina madura é formada por dois compartimentos funcionais, o endométrio e miométrio. O endométrio é o revestimento interno do útero e é derivado da camada interna do tecido mesênquimal. Histologicamente, é constituído por dois tipos de epitélios, o epitélio luminal (EL) e o epitélio glandular (EG), que são dois compartimentos estratificados do estroma, incluindo uma zona estromal densamente organizada e uma zona estromal mais frouxamente organizada, vasos sanguíneos e células imunes. O miométrio é o componente muscular (músculo liso) da parede uterina e inclui uma camada interna circular derivada de uma camada intermediária de células mesenquimais dos ductos e uma camada exterior longitudinal derivada do mesênquima subperimetrial (GRAY et al., 2001).

Eventos morfogenéticos para o desenvolvimento uterino de todos os mamíferos baseiam-se em organização e estratificação do estroma endometrial, diferenciação e desenvolvimento do miométrio e o desenvolvimento coordenado das glândulas endometriais (BARTOL et al., 1993). A formação de glândulas uterinas envolve a diferenciação e brotação do EG a partir do EL, a penetração do estroma uterino por tubos do EG e extenso enrolamento e ramificação do EG. Neste contexto, a

adenogênese endometrial em humanos inicia-se no período fetal e é completada após o nascimento. Por outro lado, é primariamente um evento pós-natal em ovelhas, porcos e bovinos. Conseqüentemente, neonatos ovinos surgiram como modelos atraentes para estudos dos mecanismos que regulam estes processos. Embora a adenogênese endometrial também seja um evento pós-natal em roedores, as características morfológicas são diferentes da maioria das outras espécies de mamíferos (GRAY et al., 2001).

A exposição inadequada do sistema reprodutor feminino a esteróides durante períodos críticos do desenvolvimento uterino pode atrapalhar os eventos organizacionais necessários para o crescimento e diferenciação uterina, podendo levar a fenótipos adultos alterados e diminuição da eficiência reprodutiva (GRAY et al., 2001). Desta maneira, a dose e o período de exposição a agentes hormonais também está diretamente relacionada aos efeitos sobre o desenvolvimento dos órgãos e funções reprodutivas (COOPER; KAVLOCK, 1997).

Todavia, o mecanismo pelo qual a exposição crônica à progesterona inibe a adenogênese no endométrio uterino de borregas recém-nascidas não está bem definido. Contrariamente, em ratas, está bem estabelecido que a progesterona inibe a proliferação celular epitelial uterina (GRAY et al., 2000). Sabe-se que em ratas a progesterona inibe a ativação induzida por estrógenos, expressão de ciclina, e fosforilação de retinoblastoma no EG. Além dos efeitos sobre o ciclo celular, um efeito clássico da progesterona é o de suprimir a expressão de ER α no epitélio e estroma endometrial do útero de ovelhas adultas (SPENCER; BAZER, 1995).

Em suínos e ovinos, o aparecimento de glândulas endometriais entre o nascimento e o dia 14 pós-natal envolve o desenvolvimento de fenótipo ER α positivo, e aumento da síntese de DNA em glândulas nascentes no EG (BARTOL et al., 1988; SPENCER et al., 1993; TARLETON et al., 1998; TAYLOR et al., 2000). Assim, a adenogênese endometrial parece requerer ER α ativado, já que a gênese glandular em suínos recém-nascidos é inibida pela administração do antagonista de ER ICI 182,780. Curiosamente, a administração de ICI a fêmeas neonatais inibiu a proliferação celular no EG e aumentou a densidade de células de estroma. Alterações no estroma poderiam perturbar interações célula-célula necessárias para a formação, proliferação e ramificação do EG (TARLETON et al., 1999).

No útero de ratas em desenvolvimento, o mesênquima organiza e induz padrões de desenvolvimento epitelial, e o epitélio é obrigado a apoiar a organização e diferenciação do estroma endometrial e do miométrio (CUNHA; LUNG, 1979; CUNHA et al., 1983). Além disso, as interações epitélio-mesênquima foram implicadas no desenvolvimento das glândulas endometriais no útero de neonatos ovinos e suínos (SPENCER et al., 1993; BARTOL et al., 1999). Conseqüentemente, os estudos demonstram que a progesterona pode bloquear adenogênese endometrial por inibição do ciclo celular na transição do EL para o estroma; pela supressão do gene que expressa o ER α ; e / ou alterando interações essenciais epitélio-mesênquima (GRAY et al., 2000).

Conforme descrito por Bartol et al. (1993), a inadequada exposição de suínos neonatos a valerato de estradiol desde o nascimento até o dia 13 não afetou a taxa de ovulação das fêmeas adultas, porém causou redução da sobrevivência embrionária em 22% aos 45 dias de gestação. Com estes resultados, os autores afirmaram que desreguladores endócrinos utilizados em neonatos podem causar efeitos permanentes sobre a estrutura e função uterina no suíno adulto.

Similarmente, na espécie bovina, bezerras recém-nascidas expostas a implantes de progesterona e benzoato de estradiol do nascimento a puberdade, apresentaram redução do peso uterocervical em 35%, da área miometrial em 27% e ablação parcial do desenvolvimento das glândulas endometriais, com redução em 40%. Deste modo, a exposição de bezerras recém-nascidas a estes hormônios pode causar efeitos profundos na morfologia uterina 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).

Em ovinos, o desenvolvimento das glândulas endometriais é um evento pós-natal que pode ser totalmente inibido pela exposição crônica à progesterona sintética após o nascimento. Quando adultas, as ovelhas tratadas não possuem glândulas endometriais, exibindo um fenótipo denominado “*uterine gland-knockout*” (UGKO), fenótipo desenvolvido por este grupo de pesquisadores, e que vem sendo útil como modelo experimental para o estudo da função endometrial (BARTOL et al., 1997), como por exemplo o tempo de exposição necessário à progesterona desde o nascimento para produzir o fenótipo UGKO em ovelhas, se ovelhas UGKO exibiriam ciclos estrais normais, e se ovelhas UGKO poderiam estabelecer e / ou manter a

gestação. 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, inibindo a capacidade dos tecidos uterinos para apoiar o estabelecimento e / ou manutenção de uma gestação (GRAY et al., 2000). Neste sentido, a infertilidade das ovelhas UGKO parece resultar da falta de glândulas endometriais e, por conseguinte, das suas secreções (histótrofo) que são de fundamental importância para suportar o crescimento e o desenvolvimento de conceptos (GRAY et al., 2001).

Em equinos, a obtenção de potranças e éguas com reduzida formação de glândulas endometriais levaria a um modelo experimental ideal como o obtido em ovinos, bovinos e suínos (modelo UGKO) para estudar o papel do leite uterino, fatores de crescimento uterino, ovariano e hormônios embrionários na promoção do crescimento embrionário normal, levando à placentação e manutenção da gestação nesta espécie. No entanto, Wilsher et al. (2009), por meio do uso exógeno de progesterona e estrógeno desde o nascimento até os seis meses de idade em potranças, não obtiveram bons resultados para chegar ao modelo UGKO. 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, bem como redução da expressão de receptor de estrógeno- α (ER- α). Pelo contrário, os hormônios exógenos utilizados estimularam sua expressão. Além disso, a expressão do receptor de progesterona (PR) também foi induzida no estroma glandular e no epitélio superficial. Neste sentido, os 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 uterinas é um evento pós-natal, ocorrendo majoritariamente entre o nascimento e o dia 60º dia de vida. Todavia, não há descrição na literatura consultada sobre o efeito de hormônios esteroides no desenvolvimento das glândulas endometriais em cadelas.

CAPÍTULO 1

**Ablação parcial do desenvolvimento das glândulas endometriais em cadelas
após exposição a progestágeno no período neonatal**

Artigo a ser submetido à publicação no periódico Theriogenology

3 Cap. 1 – Ablação parcial do desenvolvimento das glândulas endometriais em cadelas após exposição a progestágeno no período neonatal

Teixeira, N.S.¹; Volpato, R.²; Ramos, J.L.G.¹; Martins, B.B.¹; Freitas, P.M.C.³; Lopes, M.D.²; Laufer-Amorim, R.²; Luz, M.R.*^{1,3}

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

²FMVZ, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho;

³Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais;

3.1 RESUMO

Cadelas com útero desprovido de glândulas endometriais, fenótipo denominado **uterine gland-knockout** (UGKO), seriam animais estéreis, e poderiam contribuir para o controle populacional da espécie. Como a exposição inadequada do sistema reprodutor feminino a esteróides durante períodos críticos do desenvolvimento uterino pode levar a formação deste fenótipo, como observado em vacas, ovelhas e ratas, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito de aplicações seriadas (do nascimento aos 6 meses de idade) de acetato de medroxiprogesterona sobre o desenvolvimento de glândulas endometriais em cadelas. Dezesesseis fêmeas, sem raça definida, de ninhadas diferentes, foram 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 à 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, foi realizada ovariectomia em todos os animais, e amostras dos cornos uterinos foram coletadas e fixadas para exames histológico e imunohistoquímica. Foram mensuradas a espessura total (μm) da parede uterina, endométrio (μm); miométrio (μm), diâmetro das glândulas endometriais (μm), número de glândulas endometriais/ mm^2 , altura do

epitélio (μm) e a expressão dos receptores de ER $-\alpha$, ER- β e PR no epitélio superficial e estroma endometrial. As cadelas do grupo MPA apresentaram redução de 35% no número de glândulas endometriais, além de maior diâmetro das glândulas, maior espessura da parede uterina, do endométrio e miométrio, e da altura do epitélio. Não foram observadas diferenças estatísticas entre grupos em relação à expressão dos receptores ER- α , ER- β e PR, tanto no epitélio superficial como no estroma endometrial. Conclui-se que aplicações seriadas de acetato de medroxiprogesterona, do nascimento aos 6 meses de idade, não são capazes de causar ablação total no desenvolvimento de glândulas endometriais em cadelas, mas uma redução de 35% no seu desenvolvimento.

Palavras-chave: canino, útero, morfometria, receptores de estrógenos, receptor de progesterona.

3.2 ABSTRACT

Bitches with uterus devoid of endometrial glands, phenotype called uterine gland-knockout (UGKO), should be sterile animals, and could contribute to the species overpopulation control. Since the inadequate exposure of the female reproductive system to steroids during critical periods of development can lead to the formation of this phenotype, as observed in cows, sheep and rats, the aim of this study was to evaluate the effect of serial applications (from birth to 6 months old) of medroxyprogesterone acetate on the development of endometrial glands in the bitch. Sixteen cross-bred females, from different litters, were 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 to age of 6 months, and C ($n = 8$), control females, untreated, that received injections of 0.9% NaCl solution, treated similarly. At age of 6 months, ovariohysterectomy was performed in all animals, and samples of uterine horns were collected and fixed for histologic and immunohistochemical analyzes. We measured the total thickness (μm) from the uterine wall, endometrium (μm); myometrium (μm), diameter of the endometrial glands (μm), number of endometrial glands / mm^2 , epithelial height (μm) and expression of ER $-\alpha$, ER- β and PR in the surface epithelium and endometrial stroma. Bitches from MPA group showed 35% reduction in the number of endometrial glands,

endometrial glands with larger diameter, greater uterine wall, endometrium and myometrium thickness, and the height of the epithelium. There were no statistical differences between groups in relation to the expression of ER- α , ER- β and PR in both the surface epithelium and in endometrial stroma. It is concluded that serial applications of medroxyprogesterone acetate, from birth to 6 months old are not able to cause total ablation in the development of endometrial glands in the bitch, but a 35% reduction in its development.

Keywords: canine, uterus, morphometry, estrogen receptor, progesterone receptor.

3.3 INTRODUÇÃO

A superpopulação canina é uma realidade em muitas cidades mundiais, principalmente em países em desenvolvimento, sendo um desafio para a saúde pública e o bem-estar animal. Tal descontrole da população de cães é algo que representa um problema nos centros urbanos. Os cães podem agir como reservatórios de doenças, algumas de caráter zoonótico, causando riscos à saúde pública e incômodos variados, como acidentes de trânsito e acúmulo de dejetos, entre outros (DE PAULA, 2010).

A cadela é uma espécie monoéstrica, poliovulatória, e predominantemente não-estacional (CONCANNON et al., 1989). Os ovócitos são ovulados em estágio de vesícula germinativa e completam sua maturação nas trompas de falópio (YASUYUKI et al., 2008), permanecendo viáveis e fertilizáveis por até 200 horas (ENGLAND et al., 2006). Além disso, o espermatozoide canino pode ficar viável no interior do sistema reprodutivo da fêmea por até 11 dias (DOAK et al., 1967). Estas características fazem da cadela uma espécie de alta fertilidade.

Várias metodologias têm sido utilizadas no sentido de buscar controle populacional na espécie. Entre as principais medidas de controle, tem-se esterilização cirúrgica pela ovário-histerectomia (OSH) e as terapias hormonais. No entanto, apesar da cirurgia de esterilização ser um método relativamente seguro e irreversível, é oneroso ao proprietário e pode oferecer riscos ao paciente, como todo processo cirúrgico invasivo (HOWE, 2006; SANTOS et al., 2009). Já as terapias hormonais largamente utilizadas, como progestágenos para prevenção da

manifestação do estro ou bloqueio da ovulação em fêmeas no estro, e os estrógenos, que previnem a implantação embrionária em cadelas fertilizadas, provocam vários efeitos colaterais, como piometra, neoplasia mamária e aplasia de medula óssea com trombocitopenia e morte (BOWEN et al., 1985; SELMAN et al., 1995; GOBELLO et al., 2003). Desta forma, novos métodos para controle populacional devem ser desenvolvidos (DE PAULA, 2010).

O útero de todos os mamíferos contém glândulas endometriais que sintetizam o histótrofo, uma mistura complexa de substâncias necessárias ao desenvolvimento embrionário antes da placentação (PERRY; CROMBIE, 1982; GERSTENBERG et al., 1999; STEWART et al., 2000). Assim, estudos já comprovaram que as glândulas endometriais são de fundamental importância para a sobrevivência do conceito e início de seu desenvolvimento (BAZER, 1975; ROBERTS; BAZER, 1988; CARSON et al., 2000).

A exposição inadequada do aparelho reprodutor feminino a esteroides durante períodos críticos do desenvolvimento uterino pode levar a formação de fenótipos adultos alterados, estéreis ou com diminuição da eficiência reprodutiva (GRAY et al., 2001). Na espécie bovina, bezerras recém-nascidas expostas a implantes de progesterona e benzoato de estradiol do nascimento a puberdade, apresentaram redução do peso uterocervical, da área miometrial e ablação parcial do desenvolvimento das glândulas endometriais (BARTOL et al., 1995). Similarmente, ovelhas tratadas no período neonatal com progestágenos não possuem glândulas endometriais, exibindo um fenótipo denominado "*uterine gland-knockout*" (UGKO) (BARTOL et al., 1997).

As glândulas endometriais são responsáveis pela síntese e secreção do histótrofo (PERRY ; CROMBIE, 1982; GERSTENBERG; ALLEN, 1999; STEWART et al., 2000), substância responsável pela nutrição do conceito antes da implantação (BAZER, 1975; ROBERTS; BAZER, 1988; CARSON et al., 2000; GRAY et al., 2000). Em ovinos, suínos e bovinos seu desenvolvimento é um evento pós-natal variando do nascimento ao dia 120º de vida, dependendo da espécie (GRAY et al., 2001). Recentemente foi demonstrado que na espécie canina o desenvolvimento glandular ocorre entre o nascimento e o dia 60º de vida (COOKE et al., 2012; RAMOS, 2012).

Sabe-se que terapias hormonais podem alterar o desenvolvimento das glândulas endometriais quando esses animais são expostos durante o período

crítico do desenvolvimento uterino (GRAY et al., 2001). Em cadelas, o desenvolvimento de fêmeas com o fenótipo UGKO poderia ser útil, pois as mesmas seriam estéreis, e poderia ser desenvolvida uma metodologia para controle populacional. Todavia, não há descrição na literatura sobre o efeito de hormônios esteroides no desenvolvimento das glândulas endometriais em cadelas. Assim, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito de aplicações seriadas (do nascimento aos 6 meses de idade) de acetato de medroxiprogesterona sobre o desenvolvimento de glândulas endometriais em cadelas.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Animais

Dezesseis filhotes sem raça definida, fêmeas, no dia 1 após o nascimento, foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: Grupo MPA (n = 8) recebeu o tratamento com aplicações subcutâneas (SC) de MPA (10 mg / kg de peso corporal) em intervalos de 3 semanas (KOOISTRA et al., 1997), desde o dia 1 após nascimento até à idade de 6 meses, e Grupo C (n = 8) serviu como animais-controle não tratados. Os animais foram mantidos em baias individuais, com acesso a água e ração *ad libitum* e avaliados clinicamente uma vez a cada semana. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Ao término do experimento todos os animais foram doados.

3.4.2 Obtenção de Amostras e Preparação Histológica

Aos 6 meses, a ovário-histerectomia foi realizada em todos os cães e as amostras de ambos os cornos uterinos foram coletadas, fixadas para exame

histológico de Hematoxilina-Eosina (H & E) e imunoistoquímica (IHQ). Foi coletado um fragmento de cada corno uterino de cada animal, totalizando 32 amostras. Para tal, receberam como pré-anestésico 0,1 mg / kg IM de acepromazina (Acepran 0.2%; Vetnil, Louveira, SP, Brasil), e após induzidos com 5.0 mg / kg IV de propofol (Propovan; Cristália, São Paulo, SP, Brasil). Após a indução os animais foram mantidos com anestesia inalatória com isoflurano (Forane, Baxter, USA).

Após fixação em formol 10% por 24 horas, as amostras foram incluídas em parafina. Cortes de 3 μ m foram obtidos, montados em lâminas com extremidade fosca e corados em H&E para análise histológica, a qual incluiu o tipo de epitélio superficial, quantidade de glândulas endometriais e a disposição das fibras do tecido conjuntivo do endométrio e das fibras do estrato muscular. Foram mensuradas a espessura total (μ m) da parede uterina, endométrio total (μ m); miométrio (μ m), diâmetro das glândulas endometriais (μ m), número de glândulas endometriais / mm², altura do epitélio (μ m). Para avaliação de espessura total, endométrio total, miométrio e altura do epitélio foram avaliados 5 campos por amostra histológica. Para o cálculo do diâmetro glandular foram avaliadas 10 glândulas / amostra. As mensurações foram realizadas utilizando-se o programa ImageJ 1.43u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

3.4.3 Avaliação Imunohistoquímica

Novos cortes de 3 μ m foram realizados e colocados em lâminas com extremidade fosca, previamente tratadas com Poly-L-lysina (Poly-L-lysine® – Sigma Chemical Co.- USA). Para a desparafinização do material embocado, as lâminas foram mantidas em estufa a 55°C por 24 horas e, posteriormente, colocadas em cuba de vidro com xilol à temperatura ambiente por 30 minutos e, a seguir mantidas em uma nova solução de xilol por 20 minutos. As lâminas foram transferidas para cubas de vidro para a hidratação em banhos de álcool, permanecendo por três minutos em cada cuba (álcool absoluto I, II, III, álcool 95% e 85%). Posteriormente as lâminas foram submetidas a dez passagens de água destilada.

Para a detecção de ER- α , β e PR realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM com incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako-USA). Posteriormente, bloqueou-se a peroxidase endógena em solução de

água oxigenada 8% por 20 min, 5 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico®) 3g/100mL por 60 min seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base® – Sigma Chemical Co. – USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:50 (anticorpo monoclonal mouse anti-human estrogen receptor α clone 1D5, Dako, CA, USA. M7047; e anticorpo monoclonal N. 1546, Immunotech, France), em câmara úmida durante 18h à temperatura de 4°C. Para a detecção de ER- β a técnica diferiu apenas na incubação, que foi realizada em microondas, potencia máxima (750W), por 15 minutos; e na diluição do anticorpo, de 1:100 (Anticorpo monoclonal mouse anti-human estrogen β clone PPG5/10, Dako, CA, USA. M7292) (Volpato, 2011). Foi avaliada a expressão dos receptores de ER- α e PR no epitélio superficial e estroma endometrial. Em cada lâmina foram contadas 200 células para núcleos corados.

3.4.4 Análise Estatística

Foi realizada análise descritiva das avaliações histológicas e os dados morfométricos foram analisados pelo teste de Tukey, mediante utilização do aplicativo Sistema para Análises Estatísticas (SAEG), versão 9.1 (2007). Os dados de imunistoquímica foram analisados com auxílio do software GraphPad Prism 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste de Kolmogorov-Smirnoff. As diferenças estatísticas foram estabelecidas de acordo com o teste T de *Student*, sendo que as análises foram consideradas significativas quando o valor de p foi ≤ 0.05 .

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Análise Histológica

Tabela 1: Média e erro-padrão do número de glândulas/mm², diâmetro glândular, espessura de parede uterina, endométrio e miométrio e altura do epitélio em cadelas tratadas com MPA ou controle (C).

Estrutura	MPA	C
número de glândulas endometriais / mm ²	6,83 ± 0,43 ^a	9,51 ± 0,39 ^b
diâmetro das glândulas endometriais	42,23 ± 1,36 ^a	30,97 ± 0,93 ^b
espessura de parede uterina	1526,33 ± 21,06 ^a	1326,75 ± 50,56 ^b
espessura de endométrio	613,67 ± 10,45 ^a	463,40 ± 32,06 ^b
espessura de miométrio	923,26 ± 12,50 ^a	870,77 ± 14,32 ^b
altura do epitélio	9,04 ± 0,06 ^a	7,44 ± 0,13 ^b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si pelo teste T de Student ($p \leq 0.05$).

O útero das cadelas do grupo MPA apresentou endométrio cilíndrico simples com lâmina própria do epitélio visível com glândulas endometriais revestidas por epitélio escamoso simples ou cilíndrico simples. O miométrio em algumas análises apresentou-se com grandes vasos irregulares evidentes. O perimétrio apresentado consistiu de tecido conjuntivo frouxo. Nas cadelas do Grupo C, o endométrio uterino mostrou epitélio cubóide simples e na presença de glândulas endometriais, lâmina própria tubular com epitélio cúbico e / ou cilíndrico, o último com dobras irregulares. No miométrio foram observadas camadas musculares lisas com grandes vasos. O perimétrio apresentado consiste de tecido conjuntivo frouxo (Figura 1).

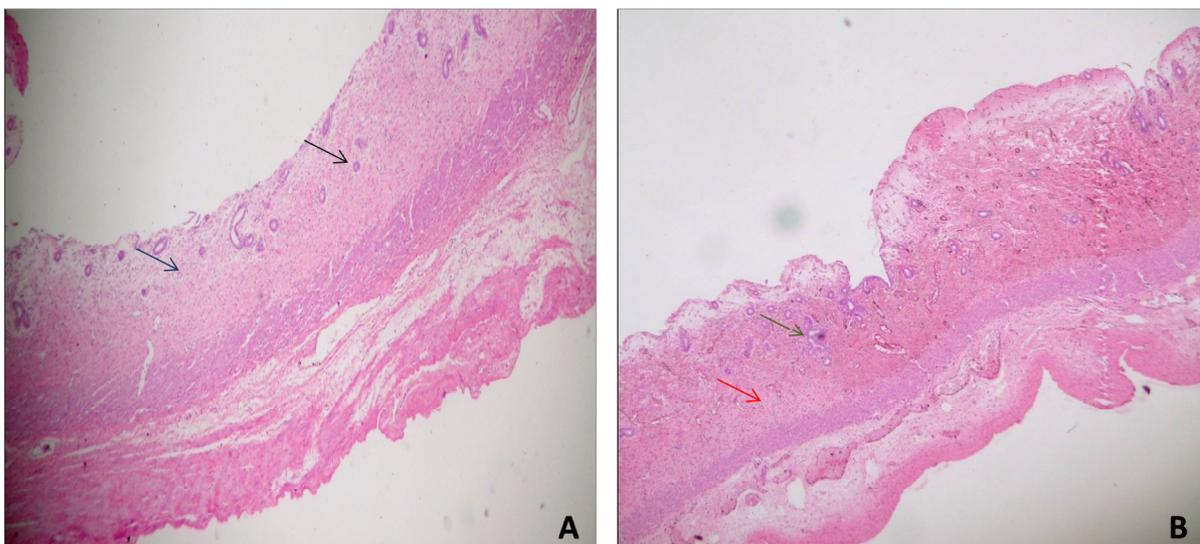


Figura 1 – Fotomicrografia do útero de cadelas tratadas MPA (A) ou controle (B). A. Observar presença de pequenas glândulas endometriais (seta preta), estroma glândular (seta azul). B. Observar presença de glândulas endometriais maiores (seta verde), estroma glandular (seta vermelha).

3.5.2 *Imunoistoquímica*

Os resultados não mostraram diferenças estatísticas em relação à expressão do receptor de progesterona (PR) (68.25 ± 15.65 e 81.25 ± 22.57) ($P=0.3181$), expressão do receptor de estrógeno (ER- α) (88.50 ± 10.04 e 87.75 ± 9.662) ($P=0.8330$) e expressão do ER- β (23.25 ± 36.16 e 26.75 ± 23.18) ($P=0.7209$) no epitélio superficial, entre os Grupos MPA e C, respectivamente. Da mesma forma, também não houve diferença significativa na expressão de PR ($74,50 \pm 8,932$ e $66,25 \pm 15,90$) ($P = 0,1873$), expressão de ER- α ($66,75 \pm 8,799$ e $73,75 \pm 26,27$) ($P = 0,5990$) e expressão de ER- β ($49,00 \pm 23,99$ e $24,00 \pm 13,47$) ($P = 0,1949$) no estroma endometrial, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 Expressão dos receptores PR, ER- α e ER- β , no epitélio superficial e estroma endometrial, em cadelas tratadas com MPA ou controle (C).

	MPA	C
Epitélio Superficial		
Expressão PR	68.25 \pm 15.65 ^a	81.25 \pm 22.57 ^a
Expressão ER- α	88.50 \pm 10.04 ^a	87.75 \pm 9.662 ^a
Expressão ER- β	23.25 \pm 36.16 ^a	26.75 \pm 23.18 ^a
Epitélio do Estroma		
Expressão PR	74,50 \pm 8,932 ^a	66,25 \pm 15,90 ^a
Expressão ER- α	66,75 \pm 8,799 ^a	73,75 \pm 26,27 ^a
Expressão ER- β	49,00 \pm 23,99 ^a	24,00 \pm 13,47 ^a

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste T de Student ($p \leq 0.05$).

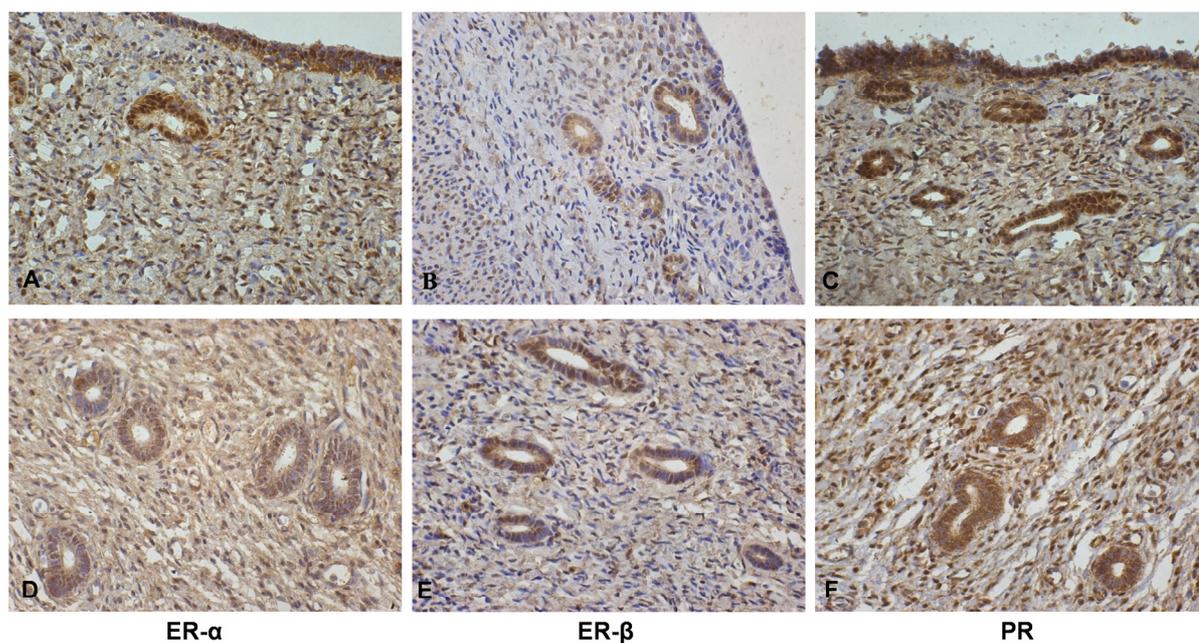


Figura 2 - Expressão dos receptores ER- α (A e D), ER- β (B e E) e PR (C e F) no epitélio superficial e estroma endometrial.

3.5.3 Alterações Clínicas

Os animais do grupo MPA apresentaram discreta hipertrofia mamária, que se iniciou logo após a primeira aplicação, e que foi diminuindo após a última aplicação aos 6 meses de idade, porém sem desaparecer. Além disso, apresentaram hipertrofia de clitóris a partir de 4 meses de idade, com regressão total na idade de 19 meses. Não foram observados efeitos secundários em animais do grupo controle.

3.6 DISCUSSÃO

Hormônios esteroides vêm sendo usados para causar ablação das glândulas endometriais em diversas espécies de animais domésticos, como ovelhas e vacas, levando assim a formação do fenótipo *uterine gland knock-out* (UGKO), composto por fêmeas adultas inférteis, aparentemente como resultado da ausência de glândulas endometriais e de suas secreções, as quais mantêm o crescimento do concepto antes da formação da placenta (Gray et al., 2001).

No presente estudo, aplicações seriadas de MPA em cadelas, do nascimento até os seis meses de idade, não foram capazes de causar ablação total das glândulas endometriais, porém diminuíram em 35% o seu desenvolvimento. Similarmente, ablação total ou parcial das glândulas endometriais ocorreu em vacas que receberam progesterona associada a benzoato de estradiol (Bartol et al., 1995; Bartol et al., 1999). Sabe-se que a exposição inadequada do sistema reprodutor feminino a esteróides durante períodos críticos do desenvolvimento pode atrapalhar eventos organizacionais necessários ao crescimento e diferenciação, levando a fenótipos adultos alterados, conseqüentemente, com menor eficiência reprodutiva (Gray et al., 2001). Da mesma forma, a dosagem e o período de exposição a hormônios é também diretamente relacionado com efeitos no desenvolvimento de órgãos e funções reprodutivas (Cooper & Kavlock, 1997). Além disso, vacas tratadas com progesterona associada a benzoato de estradiol no período neonatal apresentaram reduzidas taxas de gestação, em face do menor desenvolvimento das glândulas endometriais (Bartol et al., 1995; Floyd et al., 2001). Possivelmente isso ocorreu pela menor síntese ou transporte de substâncias essenciais (histótrofo) para

a sobrevivência e desenvolvimento do concepto no período peri-implantação (Gray et al., 2001). Nas cadelas deste estudo não foi possível a avaliação da fertilidade após a exposição prolongada ao MPA, já que as mesmas foram submetidas a ovariectomia aos 6 meses de idade. Assim, o potencial da diminuição na quantidade de glândulas endometriais em afetar o desempenho reprodutivo das cadelas permanece por ser investigado.

As cadelas do grupo MPA apresentaram maior diâmetro das glândulas endometriais em comparação às do grupo controle. Este aumento de diâmetro foi resultante da ação prolongada do MPA, progestágeno com efeitos progesterone-like, capaz de aumentar a capacidade secretória glandular, o que justifica o maior diâmetro encontrado nas cadelas deste grupo. De acordo com Mulac-Jericevic e Conneely (2004), os efeitos fisiológicos da progesterona são mediados pela interação do hormônio com seu receptor (PR), o qual foi expresso tanto no epitélio superficial quanto no estroma endometrial das cadelas neste estudo.

Foi observado maior espessamento de parede uterina, endométrio, miométrio e da altura do epitélio superficial nas cadelas tratadas com MPA por 6 meses (24 semanas), em relação ao controle. Este maior espessamento de endométrio e de parede uterina pode ter sido decorrente da dilatação e secreção glandular, como descrito por De Bosschere et al. (2002) em cadelas adultas tratadas com o mesmo protocolo.

Neste estudo, os receptores ER- α , ER- β e PR foram normalmente expressos, tanto no epitélio superficial, quanto no estroma endometrial (Figura 2), sem diferença estatística entre grupos. Estes resultados diferem de Dhaliwal et al. (1999), que observaram baixos escores para ER e escore zero para PR no epitélio glandular após tratamento de cadelas com progesterona ou MPA, porém com moderada ou alta expressão de PR em outras regiões do endométrio. De fato, a progesterona diminui o número de ER e PR em tecidos uterinos de animais como cadelas e gatas (West et al., 1976; West et al., 1977; Vermeirsch et al., 1999; Vermeirsch et al., 2000), mesmo *in vitro* (Galabova et al., 2004). Todavia, De Bosschere et al. (2002) observaram escores normais para ER e PR em cadelas adultas, tratadas por 24 semanas, com o mesmo protocolo do presente estudo, demonstrando que, assim como no presente estudo, os receptores de hormônios sexuais na maioria dos tipos celulares da parede uterina escapam da down-regulation causada por

progestágenos após administração prolongada exógena. Sabe-se, também, que a expressão de ER e PR podem ocorrer independentemente da regulação por hormônios sexuais (Okulicz, 1986; Clarke, 1990). No presente estudo, as concentrações endógenas dos hormônios esteroides sexuais eram basais, por se tratarem de fêmeas pré-púberes.

A expressão de PR nas cadelas do grupo controle difere do relatado por Lessey et al. (1981), os quais não detectaram PR no sistema reprodutor de cadelas imaturas da raça Beagle que não foram submetidas a tratamentos hormonais. Entretanto, está de acordo com Cooke et al. (2012), que evidenciaram a expressão tanto de ER e PR no útero de cadelas com 1 semana de idade. Estas diferenças de resultados devem ter ocorrido pelo uso de metodologias diferentes para a avaliação da expressão dos receptores de esteroides.

Neste estudo, as únicas manifestações clínicas observadas foram aumento discreto do teto e de clitóris. Isso se deu pela presença de receptores para progesterona na glândula mamária (Concannon et al., 1981), e provavelmente na região clitoriana.

O desenvolvimento de um modelo experimental “knockout” canino seria ideal para ampliar os conhecimentos em implantação, placentação e desenvolvimento normal embrionário, bem como para o desenvolvimento de protocolos para controle de natalidade. No entanto, neste trabalho não foi possível obter o modelo UGKO. Da mesma forma, Wilsher et al. (2009) com uso de estrógenos e progesterona em potrancas, do nascimento aos seis meses de idade, não observaram ablação das glândulas endometriais.

3.7 CONCLUSÕES

Aplicações seriadas de acetato de medroxiprogesterona, do nascimento aos 6 meses de idade, causam redução de 35% no desenvolvimento de glândulas endometriais em cadelas.

3.8 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro concedido aos alunos (CAPES), à Rações DuMilho (Bomguy ®) pelo fornecimento de alimento aos animais envolvidos no experimento e às Professoras Renée Laufer-Amorim e Maria Denise Lopes da FMVZ / UNESP / Botucatu, pelo apoio na realização dos exames de imunoistoquímica.

3.9 REFERÊNCIAS

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**, v. 54, p. 287–302, 1999.

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, n.1, (suppl 1):133, 1997.

BAZER, F. W. Uterine protein secretions: relationship to development of the conceptus. **Journal of Animal Science**, v.41, n.4, p.1376–1382, 1975.

BOWEN, R. A.; OLSON, P. N.; BEHRENDT, M. D.; WHEELER, S. L.; HUSTED, P. W.; NETT, T. M. Efficacy and toxicity of estrogens commonly used to terminate canine pregnancy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 15, n.8, p.783-788, 1985.

CARSON, D. D.; BAGCHI, I.; DEY, S. K.; ENDERS, A. C.; FAZLEABAS, A. T.; LESSEY, B. A.; YOSHINAGA K. Embryo implantation. **Development Biology**, v.223, n.6, p.217–237, 2000.

CONCANNON, P. W.; SPRAKER, T. R.; CASEY, H. W.; HANSEL, W. Gross and histopathologic effects of medroxyprogesterone acetate and progesterone on the mammary glands of adult beagle bitches. **Fertility and Sterility**, v. 36, n. 3, p.373-387, 1981.

CONCANNON, P. W.; MCCANN, J. P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of the Reproduction and Fertility**, v. 12, n.39, p.3-25, 1989.

COOKE, P. S.; BORSODORF, 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.

COOPER, R. L.; KAVLOCK, R. J. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. **Journal of Endocrinology**, v.152, p.159–166, 1997.

CLARKE, I. J.; HORTON, R. J. E.; DOUGHTON, B. W. Investigation of the mechanism by which insulin-induced hypoglycemia decreases luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes. **Endocrinology**, v. 127, p. 1470–1476, 1990.

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, n. 169, p. 1209-17, 2002.

DE PAULA, P. M. C. **ESTRATÉGIAS ADICIONAIS NO CONTROLE POPULACIONAL DE CÃES DE RUA**. Curitiba, PR, 2010. 20 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná.

DOAK, R. L.; HALL, A.; DALE, H. E. Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 13, p. 51-58, 1967.

DHALIWAL, G. K.; ENGLAND, G. C.; NOAKES DE, W. The influence of exogenous steroid hormones on steroid receptors, uterine histological structure and the bacterial flora of the normal bitch. **Animal Reproduction Science**, v.56, p. 259-277, 1999.

ENGLAND, G.C.W.; BURGESS, C.M.; FREEMAN, S.L. et al. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. **Theriogenology**, v. 66, p. 1410-1418, 2006.

FLOYD, J. G.; MCELHENNEY, W. H.; HEATH, A. M.; BLAYLOCK, R. E.; NORRIS, B. E.; PEGUES, M. D.; CARSON, R. L.; COLEMAN, D. A.; BARTOL, F. F. **Fertility of beef heifers treated from birth with growth promoting implants**. In: ASAS Southern Section Abstracts, 2001.

GALABOVA, G. K., WALTER, I., AURICH, C., AURICH, J. E. Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro conditions. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 963-76, 2004.

GERSTENBERG, C. AND ALLEN, W. R. Development of the equine endometrial glands from fetal life to ovarian cycling. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, n. 17, p. 317-326, 1999.

GOBELLO, C.; CASTEX, G.; KLIMA, L.; RODRÍGUEZ, R.; CORRADA, Y. Study of two protocol combining aglepristone and cloprostenol to treat open cervix pyometra in the bitch. **Theriogenology**, v. 15, n.5, p. 901-908, 2003.

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

HOWE, L. M. Surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 500-509, 2006.

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

LESSEY, B. A.; Gorell, T. A. Nuclear progesterone receptors in the beagle uterus. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 14, p. 585-591, 1981.

MULAC-JERICEVIC, B.; Conneely, O. M. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. **Reproduction**, v. 128, n. 2, p. 139-146, 2004.

OKULICZ, W. C. Progesterone receptor replenishment during sustained progesterone treatment in the hamster uterus. **Endocrinology**, v. 118, p. 2488-2494, 1986.

PERRY, J. S.; CROMBIE, P. R. Ultrastructure of the uterine glands of the pig. **Journal of Anatomy**, v.134, p.339-350, 1982.

ROBERTS, R. M; BAZER, F. W. The function of uterine secretions. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.82, n.2, p.875–892, 1988.

SANTOS, F. C.; CORRÊA, T. P.; RAHAL, S. C.; CRESPILO, A. M.; LOPES, M. D.; MAMPRIM, M. J. Complicações da esterilização cirúrgica de fêmeas caninas e felinas. Revisão de Literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n.1, p. 8-18, 2009.

SELMAN, P. J.; VAN GARDEREN, E.; MOL, J. A.; VAN DEN INGH, T. S. Comparison of the histological changes in the dog after treatment with the progestins medroxyprogesterone acetate and proligestone. **The Veterinary Quarterly**, v.17, n. 4, p. 128-133, 1995.

STEWART, T.; SAGE, R.; STEWART, A.; CAMERON, D. Breast cancer incidence highest in the range of one species of house mouse, *Mus domesticus*. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 2, p. 446-451, 2000.

VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; LAUWERS, W.; 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.

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.

VOLPATO, R. **Avaliação clínica e imunoistoquímica do útero e cérvix de cadelas com o diagnóstico de piometra**. Botucatu, SP, 2011. 28 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista.

WEST, N. B.; VERHAGE, H. G.; BRENNER, R. M. Suppression of the estradiol receptor system by progesterone in the oviduct and uterus of the cat. **Endocrinology**, v. 99, p.1010-1016, 1976.

WEST, N. B.; VERHAGE, H. G.; BRENNER, R. M. Changes in Nuclear Estradiol Receptor and Cell Structure During Estrous Cycles and Pregnancy in the Oviduct and Uterus of Cats. **Biology of Reproduction**, v. 17, n. 1, p. 138-143, 1977.

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, n. 7, p. 678-684, 2009.

YASUYUKI, A.; YOSHINORI, S.; TOMOYOSHI, A.; YOSHIKO, Y. U.; NANAE, K.; NATSUMI, O.; SAORI, S.; MOHAMMED, A. A.; MAYA, O.; YOSHIYASU, K.; MASAFUMI, M.; KAZURO, M.; HIROSHI, S. Cryopreservation of Canine Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 363–368, 2011.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este projeto buscou-se contribuir com o desenvolvimento de uma nova estratégia para colaborar com o controle populacional de cães de rua por meio da inibição do desenvolvimento das glândulas endometriais nesses animais, causando assim esterilidade. Contudo, ainda necessita-se de mais estudos sobre o assunto, visto que não foi possível causar ablação total destas glândulas com o protocolo utilizado (aplicações seriadas de acetato de medroxiprogesterona em neonatos caninos).

A elaboração de políticas públicas de controle populacional de cães devem ser baseadas em conhecimentos relativos ao bem-estar dos animais envolvidos e é essencial para o desenvolvimento de estratégias éticas de controle da população de cães urbanos, contribuindo para efetivo controle de problemas de saúde pública de forma eficaz do ponto de vista técnico e aceitável do ponto de vista da ética social vigente.

5. REFERÊNCIAS

AMATRUDA, T. T.; KOEFFLER, H. P. (1986) in **Retinoids and Cell Differentiation** (Sherman, M. I., ed.), pp. 79-103, CRC Press, Boca Raton, FL.

AMBRÓSIO, C. E.; BROLIO, M. P.; MARTINS, D. S.; MORINI JR., J. C.; CARVALHO, A. F.; MIGLINO, M. A. Endometrial alterations, early placentation and maternal fetal interaction in carnivores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.217-228, 2011.

BARTOL, F. F.; WILEY, A. A.; COLEMAN, D. A.; WOLFE D. F.; RIDDELL, 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, n.2, p.3000-3009, 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**, v.48, n.2, p.99–116, 1993.

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, n.2, 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, n.1, (suppl 1):133, 1997.

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**, v.54, n.2, p.287-302, 1999.

BAZER, F. W. Uterine protein secretions: relationship to development of the conceptus. **Journal of Animal Science**, v.41, n.4, p.1376–1382, 1975.

BETTERIDGE, K. J. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. **Theriogenology**, v.44, n.2, p.1061-1098, 1995.

BOWEN, R. A.; OLSON, P. N.; BEHRENDT, M. D.; WHEELER, S. L.; HUSTED, P. W.; NETT, T. M. Efficacy and toxicity of estrogens commonly used to terminate canine pregnancy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 15, n.8, p.783-788, 1985.

BROWN, R. G.; BOWEN, W. D.; EDDINGTON, J. D.; KIMMINS, W. C.; MEZEI, M.; PARSONS, J. L.; POHAJDAK, B. Evidence for a long-lasting single administration contraceptive vaccine in grey seals. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 23, n.6, p. 213-219, 1997.

CARSON, D. D.; BAGCHI, I.; DEY, S. K.; ENDERS, A. C.; FAZLEABAS, A. T.; LESSEY, B. A.; YOSHINAGA K. Embryo implantation. **Development Biology**, v. 223, n.6, p.217–237, 2000.

COOPER, R. L.; KAVLOCK, R. J. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. **Journal of Endocrinology**, v.152, n.4, p.159–166, 1997.

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, n.5, p. 1787–1795, 2012.

CUNHA, G. R.; LUNG, B. The importance of stroma in morphogenesis and functional activity of urogenital epithelium. **In Vitro**, v. 15, n. 1, p. 50-71, 1979.

CUNHA, G. R.; SHANNON, J. M.; VANDERSLICE, K. D.; MCCORMICK, K.; BIGSBY, R. M. Autoradiographic demonstration of high affinity nuclear binding and finite binding capacity of estradiol in mouse vaginal cells. **Endocrinology**, v. 113, n.4, p. 1427-1430, 1983.

DANILOVICH, N.; SAIRAM, R. M. Recent female mouse models displaying advanced reproductive aging. **Experimental Gerontology**, v. 41 n. 2, p. 117-122, 2006.

DE PAULA, P. M. C. **ESTRATÉGIAS ADICIONAIS NO CONTROLE POPULACIONAL DE CÃES DE RUA**. Curitiba, PR, 2010. 20 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná.

ENGLAND, G.C.W.; BURGESS, C.M.; FREEMAN, S.L. et al. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. **Theriogenology**, v. 66, p. 1410-1418, 2006.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. 2 ed. Philadelphia: WB Saunders. 1995, cap. 18, p.547-570.

FIENI, F.; Tainturier, D.; BRUYAS, J. F.; BADINAND, F.; BERTHELOT, X.; RONSIN, P.; RACHAIL, M.; LEFAY, M. P. Etude clinique d'une anti-hormone pour provoquer l'avortement chez la chienne. **Rec Medicine Veterinary**, v. 172, n. 7, p. 359-367, 1996.

GERSTENBERG, C. and ALLEN, W. R. Development of the equine endometrial glands from fetal life to ovarian cycling. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, n. 17, p. 317-326, 1999.

GOBELLO, C.; CASTEX, G.; KLIMA, L.; RODRÍGUEZ, R.; CORRADA, Y. Study of two protocols combining aglepristone and cloprostenol to treat open cervix pyometra in the bitch. **Theriogenology**, v. 15, n.5, p. 901-908, 2003.

GOBELLO, C. Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: A review. **Theriogenology**, v. 66, n.8, p. 1560-1567, 2006.

GRAY, C. A.; BARTOL, F. F.; TAYLOR, K. M.; WILEY, A. A.; RAMSEY, W. S.; OTT, T. L.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. The ovine uterine gland knockout model: effects of gland ablation on the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.62, n.6, p.448–456, 2000.

GRAY, C. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. Effects of Neonatal Progestin Exposure on Female Reproductive Tract Structure and Function in the Adult Ewe. **Biology of Reproduction**, v.64, n.3, p.797–804, 2001.

GUDERMUTH, D. F.; CONCANNON, P. W.; DAELS, P. F.; LASLEY, B. L. Pregnancy-specific elevations in fecal concentrations of estradiol, testosterone and

progesterone in the domestic dog (*Canis familiaris*). **Theriogenology**, v. 15, n. 2, p. 237-248, 1998.

HOWE, L. M. Surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 500-509, 2006.

JEWGENOW, K.; PENFOLD, K. L.; MEYER, H. H. D.; WILDT, D. E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, n. 17, p. 39-47, 1998.

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

LOPES, G. A. M. et al. Imunoconcepção em mamíferos com ênfase no controle populacional de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.4, p.159-166, 2005.

LOPES, C. A. P. **Utilização da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais para a avaliação In vitro do potencial de anticorpos anti-zona Pelúcida para a imunoesterilização de cadelas**. Fortaleza, CE, 2008. 20 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Ceará.

LUZ, M. R.; BERTAN, C. M. ; BINELLI, M. ; LOPES, M. D. Plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2-alpha (PGFM), progesterone and estradiol in pregnant and nonpregnant diestrus cross-bred bitches. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1436-1441, 2006.

METZGER, R. J; KRASNOW, M. A. Genetic control of branching morphogenesis. **Science**, v.284, n.6, p.1635–1639, 1999.

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

PERRY, J. S.; CROMBIE, P. R. Ultrastructure of the uterine glands of the pig. **Journal of Anatomy**, v.134, p.339-350, 1982.

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.

RINGLEB, J.; ROHLEDER, M.; JEWGENOW, K. Impact of feline zona pellucida glycoprotein B-derived synthetic peptides on in vitro fertilization of cat oocytes. **Reproduction**, v. 127, p. 179–186, 2004.

REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; VIARIS DE LESEGNO, C.; SAINT-DIZIER, M.; CHASTANT-MAILLARD, S. *In vivo* canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review. **Theriogenology**, v.66, n.2, p.1685–1693, 2006.

ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. The function of uterine secretions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, n.2, p.875–892, 1988.

SANTOS, F. C.; CORRÊA, T. P.; RAHAL, S. C.; CRESPILO, A. M.; LOPES, M. D.; MAMPRIM, M. J. Complicações da esterilização cirúrgica de fêmeas caninas e felinas. Revisão de Literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n.1, p. 8-18, 2009.

SCHLAFER, D. H.; GIFFORD, A. T. Cystic endometrial hyperplasia, pseudo-placental endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. **Theriogenology**, v. 70, p. 349-358, 2008.

SELMAN, P. J.; VAN GARDEREN, E.; MOL, J. A.; VAN DEN INGH, T. S. Comparison of the histological changes in the dog after treatment with the progestins

medroxyprogesterone acetate and proligestone. **The Veterinary Quarterly**, v.17, n. 4, p. 128-133, 1995.

SCHAFFER-SOMI, S.; BECERIKLISOY, H. B.; BUDIK, S.; KANCA, H.; AKSOY, O. A.; POLAT, B.; CETIN, Y.; AY, S. S.; ASLAN, S. Expression of genes in the canine pre-implantation uterus and embryo: implications for an active role of the embryo before and during invasion. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 656-663, 2008.

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. AND BAZER, F. W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.53, p.1527-1543, 1995.

STEWART, T.; SAGE, R.; STEWART, A.; CAMERON, D. Breast cancer incidence highest in the range of one species of house mouse, *Mus domesticus*. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 2, p. 446-451, 2000.

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

VERSTEGEN, J. P. AND ENGLAND, G. C. W. Developments in the control of reproduction in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 381–384, 1999.

VERSTEGEN-ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. Endocrinology of pregnancy in the dog: A review. **Theriogenology**, v. 70, p. 291–299, 2008.

VOORWALD, F. A.; TIOSSO, C. F.; CARDILLI, D. J.; TONIOLLO, G. H. Mummified papyraceous fetuses in the abdominal cavity of an elderly female dog with pyometra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.2, p.311-317, 2012.

WANKE, M.; LOZA, M. E.; MONACHESI, N.; CONCANNON, P. Clinical use of dexamethasone for termination of unwanted pregnancy in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 233-238, 1997.

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. 81-7, 2004.

WIEBE, V. J. AND HOWARD, J. P. Pharmacologic advances in canine and feline reproduction. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 24, p. 71-99, 2009.

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, n. 7, p. 678-684, 2009.

YASUYUKI, A.; YOSHINORI, S.; TOMOYOSHI, A.; YOSHIKO, Y. U.; NANAE, K.; NATSUMI, O.; SAORI, S.; MOHAMMED, A. A.; MAYA, O.; YOSHIYASU, K.; MASAFUMI, M.; KAZURO, M.; HIROSHI, S. Cryopreservation of Canine Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 363–368, 2011.