

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Imunolocalização e quantificação da proteína CYR61 no  
trato reprodutor de fêmeas caninas nas diferentes fases  
do ciclo estral, fêmeas pré-púberes e acometidas por  
piometra**

**Fabiana Azevedo Voorwald**

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Imunolocalização e quantificação da proteína CYR61 no  
trato reprodutor de fêmeas caninas nas diferentes fases  
do ciclo estral, fêmeas pré-púberes e acometidas por  
piometra**

**Fabiana Azevedo Voorwald**

**Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**FABIANA AZEVEDO VOORWALD** – Filha de Tânia Mara Azevedo Voorwald e Herman Jacobus Cornelis Voorwald, nascida na cidade de São Paulo – SP, no dia 30 de julho de 1982. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP) em março de 2001, concluindo-o em dezembro de 2005. Bolsista de Iniciação Científica do CNPq e do Programa de Educação Tutorial do curso de Medicina Veterinária (PET/SESU), durante o curso de graduação. Iniciou o Programa de Aprimoramento em Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal, no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV, em fevereiro de 2006, concluindo-o em fevereiro de 2008. Em março de 2008 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária pela mesma universidade, obtendo bolsa na categoria mestrado, da Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo nº 2007/57935-0).

*“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante. Não permita que ninguém negligencie o peso de sua responsabilidade. Enquanto tantos animais continuam sendo maltratados, enquanto o lamento dos animais sedentos nos vagões de carga não sejam emudecidos, enquanto prevalecer tanta brutalidade em nossos matadouros... todos nós seremos culpados. Tudo o que tem vida, tem valor como um ser vivo, como uma manifestação do mistério da vida.”*

**(Albert Schweitzer)**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Herman e Tânia, pelo amor, carinho, dedicação, exemplo e incentivo em todas as etapas de minha vida, por me ensinarem tudo que sei e tudo que sou, me apoiando e possibilitando a realização de todos os meus sonhos. Aos meus irmãos, Ana Carolina e Herman, pela amizade e companheirismo, pelas alegrias e por compartilharem comigo todos os momentos de minha vida. Que continue assim, que nossos laços tão fortes sejam eternos. À todos vocês, que possibilitam que nossa família seja tão harmônica e feliz.

Aos meus avós queridos, Vó Célia, Vô Jorge, Vó Cátia, e demais familiares, pelo carinho, pelas lições e ensinamentos.

Ao meu namorado Caio, que com amor e companheirismo me incentivou a percorrer com força e determinação essa etapa de minha vida, e que junto comigo, cresce e amadurece todos os dias, pessoalmente e profissionalmente.

Ao Prof. Gilson Hélio Toniollo, meu orientador, cuja atenção, dedicação e confiança foram essenciais para a realização de meu trabalho. Que me orienta, me ensina, me aconselha e me prepara profissionalmente desde a graduação, residência e mestrado.

A Profa. Mirela Tinucci Costa, pelos ensinamentos, auxílio no desenvolvimento das minhas lâminas de imunoistoquímica, conselhos na qualificação e por emprestar o laboratório com imensa boa vontade.

À Profa. Renée Laufer Amorim, pela fundamental participação neste trabalho, pelos ensinamentos, esclarecimentos de dúvidas, pela excelente disciplina ministrada em Jaboticabal, por me receber tão bem em Botucatu me ensinando toda a análise realizada nas lâminas de imunoistoquímica e pela participação essencial na minha defesa.

À Profa. Laura Satiko pela fundamental participação na minha qualificação, pela paciência e ensinamentos.

Ao Prof. Jeffrey, Profa Rita e Associação Protetora dos Animais de Jaboticabal, pelas oportunidades e auxílio no desenvolvimento do meu trabalho e pelo trabalho admirável realizado junto à comunidade.

Ao Prof. João Ademir pela paciência e seriedade nas estatísticas deste trabalho.

A Profa. Márcia Rita e pós-graduando Leandro pela gentileza no empréstimo do microscópio, fundamental para a captura das fotos deste trabalho.

Ao Prof. Alessi, pela participação na banca de defesa.

Aos meus amigos e companheiros de Guará, Vivinha, Gaby, Ricardo, Lourdes, Azul, pelas risadas, pelo carinho, amizade e auxílio em todos os momentos.

Aos amigos moradores e agregados da República Misto Quente, Komi, Carioca, Regina, Artur, Paulinha, Vera, Ana, Mirrasga, Renata, e à Josie, que cuida de todos nós com paciência e dedicação.

Aos amigos e colegas do Setor de Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal – FCAV/UNESP, Valeska, Puff (pra sempre), Michele, Denise, Luciana, Diogo, Marco, Paulinha, Tathi, Eliandra, Maricy, Aracelle, Karin e outro. A Kellen por iniciar a linha de pesquisa com marcação do CYR61 por meio de imunoistoquímica, sob orientação do Prof. Gilson.

A Anésia, querida amiga, pelas risadas, conversas e ensinamentos.

Ao Serviço de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP.

Aos companheiros do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, agradeço muito a Carol que me ensinou imunoistoquímica com muito rigor e critérios.

Aos residentes, ex-residentes, pós-graduandos e professores do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – FCAV/UNESP, pela troca de informações, colaborando significativamente para a minha formação profissional nesses quatro anos de hospital.

A todos os técnicos, funcionários e enfermeiros do Hospital Veterinário, Luiza, Flávia, Zezé, Ligia, Lidiane, Cristina, Ana, Dona Silvia, Dona Isildinha, Alúcio, Eugênio, Rosana, Rosa, Carlos, Sr. Isaías, Zé e outros.

Ao Sr. Orandi e Felipe, que com dedicação e amizade, me auxiliaram no processamento histológico de todo o material de meu experimento.

À Isildinha e seu Xerox, pela amizade, simpatia e bom humor, mesmo nas horas de correria, colaborando com o cumprimento de nossos prazos.

A Adolorata, professora, tutora e amiga, pela orientação, ajuda e amizade em todos esses anos.

Às funcionárias e aos funcionários da Pós-graduação.

Aos nossos cães, Lenda, Fera, Sadan, Zeus, Terra, Lillo, Chiquita, Merlim, Princesa, Luka; também àqueles que se foram, Kaiser, Gaúcho, Eva, Betina, Mel, Lua, Cão, Léo, Krista, Crila, Bonito, Steik Holder, Átila e Lacraia; aos nossos gatos, Li e Satine, aos nossos demais animais, que com amor, fidelidade e companherismo me inspiraram a construir essa carreira.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal, e professores, pela minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de estudos concedida (processo nº 07/57935-0) e pelo auxílio financeiro à pesquisa (processo nº 08/53873-3).

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a concretização de todos os meus objetivos.

A todos os animais, pela pureza e inspiração.

A Deus, por colocar em meu caminho pessoas especiais que me acompanharam nas diferentes etapas de minha vida, me dando força e me ajudando a superar todas as dificuldades.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	01
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1 Embriologia do aparelho reprodutor feminino.....	02
2.2 Anatomia e histomorfologia do trato reprodutor feminino.....	04
2.2.1 Ovários.....	04
2.2.2 Tubas uterinas.....	07
2.2.3 Corno uterino e corpo do útero.....	09
2.3 Mecanismos endócrinos da reprodução na fêmea canina.....	12
2.4 Puberdade.....	15
2.5 Ciclo estral.....	16
2.5.1 Próestro.....	17
2.5.2 Estro.....	18
2.5.3 Diestro.....	20
2.5.4 Anestro.....	21
2.6 Citologia Vaginal.....	22
2.7 Piometra.....	25
2.8 Imunoistoquímica.....	29
2.9 CYR61.....	30
III. OBJETIVO.....	35
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Seleção dos animais.....	36
4.2 Identificação da fase do ciclo estral.....	37
4.3 Coleta do material.....	39
4.4 Dosagem de progesterona e estradiol.....	40
4.5 Processamento do material.....	41
4.6 Coloração em Hematoxilina de Harris e Eosina de Lyson (HE).....	41



4.7 Imunoistoquímica.....	41
4.8 Análise morfológica.....	43
4.9 Análise imunoistoquímica.....	43
4.9.1 Análise subjetiva de intensidade e distribuição.....	43
4.9.2 Análise de área e porcentagem de área.....	49
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Determinação da fase do ciclo estral.....	57
5.2 Análise morfológica e histopatológica.....	57
5.2.1 Ovários.....	58
5.2.2 Corno uterino e corpo do útero.....	61
5.2.3 Tuba uterina.....	66
5.3 Dosagens séricas de Progesterona e estradiol.....	68
5.4 Análise de imunoistoquímica.....	74
5.4.1 Análise de área e porcentagem de área marcada.....	80
5.4.1.1 Corno uterino e corpo do útero.....	83
5.4.1.2 Tuba uterina.....	98
5.4.1.3 Ovário.....	104
5.4.2 Análise de intensidade e distribuição de marcação positiva.....	109
VI. CONCLUSÕES.....	121
VII. REFERÊNCIAS.....	122

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Área marcação positiva citoplasma
AENDC	Área marcação positiva citoplasma endométrio corpo e/ou corno uterino
AENDN	Área marcação positiva núcleo endométrio corpo e/ou corno uterino
AMIOC	Área marcação positiva citoplasma miométrio corpo e/ou corno uterino
AMION	Área marcação positiva núcleo miométrio corpo e/ou corno uterino
AN	Área marcação positiva núcleo
APA	Associação Protetora dos Animais de Jaboticabal
FB	Fibroblastos
CCE	Cordões de células epitelióides
CCN	Família conectivo cisteína nefroblastoma
CCS	Células colunares simples
CF	Células foliculares
CL	Corpo lúteo
CLG	Célula luteínica da camada granulosa
CLT	Célula luteínica tecal
CYR61	Proteína rica em cisteína, 61 kilodaltons
DAB	3,3'-diaminobenzidina-tetrahydrochloride
E	Estroma
E2	Estradiol
E2T	Valor transformado de estradiol
ECS	Epitélio cúbico simples ciliado e/ou secretor
EG	Epitélio germinativo
ER	Epitélio de revestimento
EV	Estrato vascular
FL	Folículos
FML	Fibra muscular lisa
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GI	Glândulas intersticiais
GE	Glândulas endometriais

GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HE	Hematoxilina de Harris e Eosina de Lyson
HEC	Hiperplasia endometrial cística
HEK	Human embryonic kidney cells
IEG	<i>Immediate early gene</i>
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IHQ	Imunoistoquímica
LH	Hormônio luteinizante
log	Logaritmo
LP	Lâmina própria
OH	Ovariohisterectomia
MC	Miométrio circular
ML	Miométrio longitudinal
MLA	Musculatura lisa das artérias e/ou arteríolas
n	Número de amostras
P4	Progesterona
P4T	Valor transformado de progesterona
PAC	% área marcação positiva citoplasma
PAENDC	% área marcação positiva citoplasma endométrio corpo e/ou corno uterino
PAENDN	% área marcação positiva núcleo endométrio corpo e/ou corno uterino
PAMIOC	% área marcação positiva citoplasma miométrio corpo e/ou corno uterino
PAMION	% área marcação positiva núcleo miométrio corpo e/ou corno uterino
PAN	% área marcação positiva núcleo
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
NOV	Nephroblastoma overexpressed
S	Serosa
SAS	Sistema de análise de estatística
TC	Tecido conjuntivo
VS	Vasos sanguíneos
WISP	Wnt-induced secreted protein

## LISTA DE FIGURAS

- |          |  |    |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Citologia vaginal de fêmea canina, Panótico Rápido, 10x e 40x. (A) <b>Proestro</b> : eritrócitos, células intermediárias e superficiais nucleadas e anucleadas, 40x. (B) <b>Estro</b> : células superficiais nucleadas e anucleadas, 10x, (C) <b>Diestro</b> : células parabasais, células intermediárias, células superficiais, 10x, (D) <b>Anestro</b> : células parabasais e células intermediárias, 10x (E e F) <b>Piometra</b> : células parabasais, células intermediárias, células superficiais, neutrófilos, bactérias e eritrócitos, 10x e 40x respectivamente.   | 38 |
| Figura 2 | Cirurgia de ovariectomia, realizada no Setor de Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal, do Hospital Veterinário da FCAV – UNESP. Arquivo pessoal. (A) OH eletiva, anestro. (B) OH terapêutica para piometra e, (C) terapêutica para piometra.   | 40 |
| Figura 3 | Expressão do CYR61 nos ovários das fêmeas caninas, 10x e 20x. (A e B) <b>Marcação forte</b> : folículos ovarianos, fibroblastos, glândulas intersticiais e epitélio cúbico simples, 20x e 10x respectivamente, (C e D) <b>Marcação moderada</b> : folículos ovarianos, fibroblastos da região cortical, glândulas intersticiais e epitélio cúbico simples, 20x e 10x respectivamente, (E e F) <b>Marcação fraca</b> : folículos ovarianos, corpo lúteo, fibroblastos da região cortical e epitélio cúbico simples, 20x e 10x, respectivamente.   | 45 |
| Figura 4 | Expressão do CYR61 nos ovários das fêmeas caninas, 10x, 20x e 40x. (A) <b>Marcação forte</b> : corpo lúteo, 20x, (B) <b>Marcação forte</b> : folículo ovariano primário multilaminar, 40x, (C) <b>Marcação moderada</b> : corpo lúteo, 20x, (D) <b>Marcação moderada</b> : folículo ovariano primário multilaminar, 40x, (E) <b>Marcação fraca</b> : corpo lúteo, 20x, e (F) <b>Marcação fraca</b> : folículo ovariano primário multilaminar, 10x.   | 46 |
| Figura 5 | Expressão do CYR61 no corno uterino e corpo do útero (10x), e tuba uterina (20x) das fêmeas caninas. (A) <b>Marcação forte</b> : epitélio cúbico simples e fibras musculares lisas da tuba uterina, (B) <b>Marcação forte</b> : glândulas endometriais, epitélio de revestimento, fibras musculares lisas e fibroblastos, (C) <b>Marcação moderada</b> : epitélio cúbico simples e fibras musculares lisas da tuba uterina, (D) <b>Marcação moderada</b> : glândulas endometriais, epitélio de revestimento, fibras musculares lisas e fibroblastos, (E) <b>Marcação fraca</b> : epitélio cúbico simples e fibras musculares lisas da tuba uterina e (F) | 47 |

**Marcação fraca:** glândulas endometriais, epitélio de revestimento, fibras musculares lisas e fibroblastos.

- Figura 6 Análise morfométrica de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva do CYR61, na região do endométrio e miométrio da **tuba uterina**, das fêmeas caninas, 20x. (A e E) expressão da proteína no epitélio de revestimento, fibroblastos e fibras musculares lisas, (B e F) seleção do núcleo das células que expressaram a proteína, (C e G) seleção do citoplasma das células com marcação positiva, (D e H) identificação da área nuclear e citoplasmática das células com expressão do CYR61. 51
- Figura 7 Análise morfométrica de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva na região cortical do **ovário**, das fêmeas caninas, 10x. (A e E) expressão da proteína nos componentes estruturais da região cortical dos ovários, (B e F) seleção do núcleo das células que expressaram a proteína, (C e G) seleção do citoplasma das células com marcação positiva, (D e H) identificação da área nuclear e citoplasmática das células com expressão do CYR61. 52
- Figura 8 Análise morfométrica de área e porcentagem de área de marcação citoplasmática positiva, na região do endométrio do **cornu uterino e corpo do útero**, das fêmeas caninas, 10x. (A e E) expressão da proteína no epitélio de revestimento, glândulas endometriais e fibroblastos, (B e F) seleção do núcleo das células que expressaram a proteína, (C e G) seleção do citoplasma das células com marcação positiva, (D e H) identificação da área nuclear e citoplasmática das células com expressão do CYR61. 53
- Figura 9 Análise morfométrica de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva na região do miométrio do **cornu uterino e corpo do útero**, das fêmeas caninas, 10x. (A e E) expressão da proteína nas fibras musculares lisas e fibroblastos, (B e F) seleção do núcleo das células que expressaram a proteína, (C e G) seleção do citoplasma das células com marcação positiva, (D e H) identificação da área nuclear e citoplasmática das células com expressão do CYR61. 54
- Figura 10 Análise morfométrica de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva na região do endométrio do **cornu uterino e corpo do útero**, das fêmeas caninas acometidas por piometra, 10x. (A e E) expressão da proteína no epitélio de revestimento, glândulas endometriais e fibroblastos, (B e F) seleção do núcleo das células que expressaram a proteína, (C e G) seleção do citoplasma das células com marcação positiva, (D e H) identificação da área 55

	nuclear e citoplasmática das células com expressão do CYR61.	
Figura 11	Análise morfológica de <b>ovário</b> , das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra, 5x, 10x e 20x. (A) fêmea pré-púbere, 20x, (B) fêmea na fase de proestro, 10x, (C) fêmea na fase de estro, 10x, (D) fêmea na fase de diestro, 5x, (E) fêmea na fase de anestro, 10x e, (F) fêmea acometida por piometra, 5x.	60
Figura 12	Análise morfológica de <b>cornio uterino</b> , das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra, 1,6x e 10x. (A) fêmea pré-púbere, 10x, (B) fêmea na fase de proestro, 10x, (C) fêmea na fase de estro, 10x, (D) fêmea na fase de diestro, 10x, (E) fêmea na fase de anestro, 10x e, (F) fêmea acometida por piometra, 1,6x.	63
Figura 13	Análise morfológica de <b>corpo uterino</b> , das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra, 4x, 5x e 10x. (A) fêmea pré-púbere, 4x, (B) fêmea na fase de proestro, 10x, (C) fêmea na fase de estro, 10x, (D) fêmea na fase de diestro, 10x, (E) fêmea na fase de anestro, 10x e, (F) fêmea acometida por piometra, 5x.	64
Figura 14	Análise morfológica de <b>cornio uterino</b> das fêmeas caninas acometidas por piometra, 10x e 40x. (A) epitélio de revestimento hiperplásico e hipertrofiado, alta atividade secretória, 40x, (B) destruição endometrial e alterações na morfologia do miométrio 40x, (C) epitélio das glândulas endometriais hiperplásicos, hipertrofiados e com alta atividade secretora caracterizando hiperplasia cística, 40x, (D) destruição miometrial com redução na quantidade e tamanho das fibras musculares lisas e proliferação de tecido conjuntivo entremeado, 10x.	65
Figura 15	Análise morfológica de <b>tuba uterina</b> , das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra, 20x. (A) fêmea pré-púbere (B) fêmea na fase de proestro, (C) fêmea na fase de estro, (D) fêmea na fase de diestro, (E) fêmea na fase de anestro e, (F) fêmea acometida por piometra.	67
Figura 16	(A) Valores séricos de P4 e E2 nas fêmeas caninas pré-púberes e nas diferentes fases do ciclo estral, (B) valores séricos de P4 e, (C) valores séricos de E2.	72
Figura 17	Valores séricos de P4 e E2. (A) valores de P4 nas fases de diestro, anestro e piometra, (B) valores de E2 nas fases de diestro, anestro e piometra (C) média dos valores de P4 e E2 nas fases do ciclo estral e, (D) média dos valores de P4 e E2	73

nas fases de diestro, anestro e piometra.

- |           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 18 | <p>Marcação positiva do CYR61 nos componentes epiteliais dos órgãos reprodutores das fêmeas caninas, 20x. (A) <b>Endométrio</b>: epitélio colunar simples das glândulas endometriais do corno uterino e corpo do útero, (B) <b>Endométrio</b>: epitélio colunar simples de revestimento, na tuba uterina, (C) <b>Endométrio</b>: epitélio colunar simples de revestimento no corno uterino e corpo do útero, (D) <b>Ovário</b>: folículos e fibroblastos da região cortical, (E) <b>Ovário</b>: corpo lúteo, (F) <b>Ovário</b>: glândulas intersticiais, (G) <b>Ovário</b>: folículos e epitélio cúbico simples e (G) <b>Ovário</b>: corpo <i>albicans</i>.</p> | 75 |
| Figura 19 | <p>Marcação positiva do CYR61 nos componentes estromais dos órgãos reprodutores das fêmeas caninas, 20x e 40x. (A) <b>Miométrio</b>: células musculares lisas do miométrio longitudinal do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, (B) <b>Miométrio</b>: células musculares lisas do miométrio circular do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, (C) <b>Estrato vascular</b>: células musculares lisas dos vasos dos ovários, corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, (D) <b>Ovário</b>: fibroblastos da região cortical, (E) <b>Endométrio</b>: fibroblastos da lâmina própria.</p>  | 76 |
| Figura 20 | <p>Marcação nuclear positiva e negativa do CYR61 nos diferentes componentes dos órgãos reprodutores das fêmeas caninas, 20x e 40x. (A, C, E) <b>Ovário</b>: marcação nuclear positiva nas glândulas intersticiais, corpo lúteo e folículos, (B, D, F) <b>Ovário</b>: marcação nuclear negativa nas glândulas intersticiais, corpo lúteo e folículos, (G) <b>Tuba uterina</b>: marcação nuclear positiva no epitélio de revestimento e, (H) <b>Tuba uterina</b>: marcação nuclear negativa no epitélio de revestimento.</p>  | 78 |
| Figura 21 | <p>Gráfico da relação linear positiva significativa (<math>p \leq 0,05</math>) na marcação do CYR61 nos órgãos reprodutores, (A) área com marcação citoplasmática positiva (AC) em relação aos valores de P4 e, (B) porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva (PAC) em relação aos valores de P4.</p>  | 82 |
| Figura 22 | <p>Gráfico da relação linear neutra não significativa (<math>p &gt; 0,05</math>), na marcação do CYR61 nos órgãos reprodutores, (A) área com marcação citoplasmática positiva (AC) em relação aos valores de E2 e, (B) porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva (PAC) em relação aos valores de E2.</p>   | 82 |
| Figura 23 | <p>Gráficos da relação linear significativa (<math>p \leq 0,05</math>) da área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva e valores séricos de progesterona, (A) área marcada do endométrio (AENDC) em relação à P4, (B) porcentagem de área do endométrio (PAENDC) em relação à P4, (C) área</p>   | 85 |

marcada do miométrio (AMIOC) em relação à P4 e, (D) porcentagem de área marcada do miométrio (PA) em relação à P4.

- |           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Figura 24 | Gráficos da relação linear neutra e negativa não significativa ( $p>0,05$ ) da área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva e valores séricos de estradiol, (A) área marcada do endométrio (AENDC) em relação à E2, (B) porcentagem de área do endométrio (PAENDC) em relação à E2, (C) área marcada do miométrio (AMIOC) em relação à E2 e, (D) porcentagem de área marcada do miométrio (PA) em relação à E2.                                     | 86  |
| Figura 25 | Marcação citoplasmática positiva da proteína CYR61 nos componentes epiteliais e estromais do corno uterino das fêmeas caninas, 10x e 20x. (A) fêmeas pré-púberes, 20x, (B) fêmeas na fase de proestro, 20x, (C) fêmeas na fase de estro, 20x, (D) fêmeas na fase de diestro, 20x, (E) fêmeas na fase de anestro, 20x, (F) fêmeas acometidas por piometra, 10x.   | 89  |
| Figura 26 | Marcação citoplasmática positiva da proteína CYR61 nos componentes epiteliais e estromais do corpo do útero das fêmeas caninas, 5x e 20x. (A) fêmeas pré-púberes, 20x, (B) fêmeas na fase de proestro, 20x, (C) fêmeas na fase de estro, 20x, (D) fêmeas na fase de diestro, 20x, (E) fêmeas na fase de anestro, 20x, (F) fêmeas acometidas por piometra, 5x.  | 90  |
| Figura 27 | Gráfico da relação linear significativa para os valores de estradiol e não significativa para os valores de P4, da área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no endométrio e miométrio da tuba uterina, com os valores séricos de progesterona e estradiol, (A) área marcada (AC) em relação à P4, (B) porcentagem de área (PAC) em relação à P4, (C) área marcada (AC) em relação à E2 e, (D) porcentagem de área marcada (PA) em relação à E2. | 100 |
| Figura 28 | Marcação citoplasmática positiva da proteína CYR61 nos componentes epiteliais e estromais da tuba uterina das fêmeas caninas, 10x, 20x e 40x. (A) fêmeas pré-púberes, 10x e 40x, (B) fêmeas na fase de proestro, 20x e 40x, (C) fêmeas na fase de estro, 20x e 40x, (D) fêmeas na fase de diestro, 20x e 40x, (E) fêmeas na fase de anestro, 20x e 40x, (F) fêmeas acometidas por piometra, 10x e 40x.   | 102 |
| Figura 29 | Gráfico da relação linear positiva significativa para os valores de progesterona ( $p\leq 0,05$ ) e não significativos para os valores de estradiol ( $p>0,05$ ) da área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no córtex ovariano, com os valores séricos de progesterona e estradiol, (A) área marcada   | 105 |



(AC) em relação à P4, (B) porcentagem de área (PAC) em relação à P4, (C) área marcada (AC) em relação à E2 e, (D) porcentagem de área marcada (PA) em relação à E2.

- |           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Figura 30 | <p>Marcação citoplasmática positiva da proteína CYR61 nos componentes epiteliais e estromais do ovário das fêmeas caninas, 5x e 20x. (A) fêmeas pré-púberes, 20x, (B) fêmeas na fase de proestro, 20x, (C) fêmeas na fase de estro, 20x, (D) fêmeas na fase de diestro, 5x, (E) fêmeas na fase de anestro, 20x, (F) fêmeas acometidas por piometra, 20x.</p>   | 106 |
| Figura 31 | <p>Gráfico da relação linear positiva e neutra da intensidade de marcação citoplasmática, demonstrada pelas fórmulas, com os valores séricos de progesterona e estradiol, respectivamente, nos componentes estruturais do ovário, com diferença significativa em algumas variáveis (<math>p \leq 0,05</math>) e sem em outras (<math>p &gt; 0,05</math>). (A) folículos ovarianos comparada aos valores séricos de P4, (B) folículos ovarianos comparados aos valores séricos de E2, (C) corpo lúteo comparado aos valores séricos de P4, (D) corpo lúteo comparado aos valores séricos de E2, (E) fibroblastos do estroma ovariano, comparados aos valores séricos de P4 e, (F) fibroblastos do estroma ovariano, comparados aos valores de E2.</p>   | 110 |
| Figura 32 | <p>Gráfico da relação linear negativa e neutra, demonstrada nas fórmulas, da intensidade de marcação citoplasmática positiva, com os valores séricos de progesterona e estradiol, respectivamente, nos componentes endometriais e miometriais do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, significativa (<math>p \leq 0,05</math>) e não significativa (<math>p &gt; 0,05</math>). (A) glândulas endometriais comparada aos valores séricos de P4, (B) glândulas endometriais comparados aos valores séricos de E2, (C) epitélio de revestimento comparado aos valores séricos de P4, (D) epitélio de revestimento comparado aos valores séricos de E2, (E) miométrio circular comparados aos valores séricos de P4, (F) miométrio circular comparados aos valores de E2, (G) miométrio longitudinal comparado aos valores séricos de P4 e, (H) miométrio longitudinal comparado aos valores séricos de E2.</p> | 119 |

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de p obtidos pelo teste de Tukey a 5% de significância, para as variáveis progesterona e estradiol comparadas entre fases.	68
Tabela 2	Médias, desvio padrão, valores mínimos e valores máximos de progesterona, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra. Teste de Tukey para comparação das médias, a 5% de significância.	69
Tabela 3	Médias, desvio padrão, valores mínimos e valores máximos de estradiol, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra. Teste de Tukey para comparação das médias, a 5% de significância.	71
Tabela 4	Valores de p para as variáveis de marcação citoplasmática positiva das células da região cortical do ovário, endométrio e miométrio do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, comparadas entre fases, órgãos e fases x órgãos.	80
Tabela 5	Teste de Tukey para comparação das médias $\pm$ desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva das células da região cortical do ovário, endométrio e miométrio do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, comparadas entre fases e piometra, a 5% de significância, em ordem de classificação da fase com menor marcação para a fase com maior marcação.	80
Tabela 6	Teste de Tukey para comparação das médias $\pm$ desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva das células em todas as fases, comparando-se os órgãos reprodutores, a 5% de significância, em ordem de classificação do órgão com menor marcação para o órgão com maior marcação.	81
Tabela 7	Teste de Tukey para comparação das médias $\pm$ desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no endométrio mais miométrio do corno uterino e corpo do útero, comparados entre fases e piometra, em ordem de classificação da fase com menor marcação para a fase com maior marcação.	83

Tabela 8	Valores de p para as variáveis do corno uterino e corpo do útero, comparadas entre fases, estruturas e fases x estruturas.	84
Tabela 9	Teste de Tukey para comparação das médias±desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no endométrio e miométrio do corno uterino e corpo do útero, comparados entre fases e piometra, a 5% de significância, em ordem de classificação da fase com menor marcação para a fase com maior marcação.	84
Tabela 10	Teste de Tukey para comparação das médias±desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no endométrio e miométrio do corno uterino e corpo do útero, a 5% de significância, em ordem de classificação do órgão com menor marcação para o órgão com maior marcação.	87
Tabela 11	Médias±desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasma positiva no endométrio do corno uterino e corpo do útero, comparados nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	87
Tabela 12	Médias±desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação positiva em citoplasma no miométrio do corno uterino e corpo do útero, comparados nas diferentes fases do ciclo estral e piometra, e nas duas estruturas.	88
Tabela 13	Valores de p para as variáveis AC e PAC da tuba uterina comparadas entre fases.	98
Tabela 14	Teste de Tukey para comparação das médias±desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva em endométrio e miométrio da tuba uterina, comparada nas diferentes fases do ciclo estral e piometra, a 5% de significância.	99
Tabela 15	Valores de p para as variáveis do ovário comparadas entre fases.	104
Tabela 16	Teste de Tukey para comparação das médias±desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no córtex ovariano, comparados entre fases e piometra, a 5% de significância, em ordem de classificação da fase com menor marcação para a fase com maior marcação.	104

Tabela 17	Teste de qui-quadrado para comparação das médias $\pm$ desvio padrão dos valores de intensidade de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do ovário, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	109
Tabela 18	Teste de qui-quadrado para comparação das médias $\pm$ desvio padrão dos valores de distribuição de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do ovário, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	111
Tabela 19	Comparação das médias $\pm$ desvio padrão para presença ou ausência de marcação nuclear positiva nos componentes estruturais do ovário, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	112
Tabela 20	Teste de qui-quadrado para comparação das médias $\pm$ desvio padrão dos valores de intensidade de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do corno uterino, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	113
Tabela 21	Teste de qui-quadrado para comparação das médias $\pm$ desvio padrão dos valores de distribuição de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do corno uterino, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	113
Tabela 22	Comparação das médias $\pm$ desvio padrão para presença ou ausência de marcação nuclear positiva nos componentes estruturais do corno uterino, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	114
Tabela 23	Teste de qui-quadrado para comparação das médias $\pm$ desvio padrão dos valores de distribuição de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do corpo do útero, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	115
Tabela 24	Teste de qui-quadrado para comparação das médias $\pm$ desvio padrão dos valores de distribuição de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do corpo do útero, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	115

Tabela 25	Comparação das médias±desvio padrão para presença ou ausência de marcação nuclear positiva nos componentes estruturais do corpo do útero, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	116
Tabela 26	Teste de qui-quadrado para comparação das médias±desvio padrão dos valores de distribuição de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais da tuba uterina, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	117
Tabela 27	Teste de qui-quadrado para comparação das médias±desvio padrão dos valores de distribuição de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais da tuba uterina, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	117
Tabela 28	Comparação das médias±desvio padrão para presença ou ausência de marcação nuclear positiva nos componentes estruturais da tuba uterina, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.	118
Tabela 29	Síntese das fases correspondendo à intensidade de marcação por análise subjetiva, nos componentes estruturais de cada órgão, média da distribuição encontrada em cada componente de cada tecido.	120

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Relação das estruturas e componentes avaliados na análise de intensidade e distribuição de marcação positiva.	48
----------	---	----

## **IMUNOLocalização e Quantificação da Proteína CYR61 no Trato Reprodutor de Fêmeas Caninas nas Diferentes Fases do Ciclo Estral, Fêmeas Pré-Púberes e Acometidas por Piometra**

**RESUMO** – Os órgãos reprodutores das fêmeas caninas sofrem transformações morfológicas e funcionais durante o ciclo estral, sob influência do estrógeno e da progesterona. A proteína CYR61 (proteína rica em cisteína, 61kilodaltons), mediada por citocinas inflamatórias, interleucinas, integrinas e outros, regula processos como proliferação e diferenciação celular, quimiotaxia, angiogênese e tumorigênese. É identificada em endometriose em mulheres, ratas e fêmeas de babuíno, acometidas por endometriose ou hiperplasia endometrial. Objetivou-se com este estudo imunolocalizar e quantificar a expressão da CYR61 em órgãos reprodutores das fêmeas caninas saudáveis, sob diferentes níveis séricos de progesterona e estradiol, e acometidas por piometra. Os tecidos coletados das 100 fêmeas caninas foram submetidos à técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-CYR61, e apresentaram marcação citoplasmática positiva nos componentes epiteliais em maior intensidade quando comparada aos componentes estromais. Foi identificada correlação linear positiva de área com marcação citoplasmática no ovário, corno uterino e corpo do útero, na fase lútea do ciclo estral. As tubas uterinas demonstraram maior expressão e correlação linear positiva com a fase proliferativa do ciclo estral. É possível concluir que a expressão do CYR61 está diretamente relacionada com as alterações morfológicas e funcionais dos órgãos reprodutores femininos, provocadas pelos hormônios ovarianos nas diferentes fases do ciclo estral, de forma particular sobre cada tecido, de acordo com suas funções fisiológicas.

**Palavras-chave:** útero, ovário, CYR61, canina, progesterona, estradiol

## **IMMUNOLocalIZATION AND QUANTIFICATION OF CYR61 PROTEIN IN REPRODUCTIVE TRACT OF FEMALE DOGS IN DIFFERENT PHASES OF ESTROUS CYCLE, PREPUBERAL FEMALES AND AFFECTED BY PYOMETRA**

**ABSTRACT** – The reproductive organs of female dogs suffer morphological and functional changes during the estrous cycle, under the influence of estrogen and progesterone. CYR61 protein (cystein-rich protein, 61 kilodaltons) mediated by inflammatory cytokines, interleukins, integrins and others, regulates the processes such as cell proliferation and differentiation, chemotaxis, angiogenesis and tumorigenesis. It was identified in endometriosis in women, rats and female baboon, who suffers from endometriosis or endometrial hyperplasia. The objective of this study was the immunolocalization and quantification of CYR61 expression in reproductive organs of healthy canine females under different levels of progesterone and estradiol, and females affected by pyometra. The tissues collected from 100 female dogs were subjected to immunohistochemistry analyses with anti-CYR61, and showed cytoplasmic positive reaction in higher intensity on epithelial components, when compared with stromal components. This study identified positive linear correlation of cytoplasmic area with positive reaction on the ovary and uterus in luteal phase of the estrous cycle. The fallopian tubes showed higher expression and positive linear correlation with estradiol, in proliferative phase of the estrous cycle. It was concluded that the CYR61 expression is directly related to the morphological and functional changes of the female reproductive organs, caused by the ovarian hormones at different stages of the estrous cycle in a particular way on each tissue, according to their physiological functions.

**Key-words:** uterus, ovary, CYR61, canine, progesterone, estradiol



## I. INTRODUÇÃO

A atividade reprodutiva é a expressão fisiológica de um conjunto complexo de mecanismos e fenômenos que obedecem ao controle endógeno de um sistema hierarquizado de órgãos que se inter-relacionam, utilizando avançada linguagem bioquímica. A compreensão desse universo ainda é restrita, porém, nos últimos anos, a velocidade da aquisição de conhecimento se acelerou, resultando em importantes consequências no desenvolvimento de projetos de pesquisa e estudos do sistema reprodutor das diferentes espécies de animais domésticos (BICUDO, 1999).

A regulação das atividades reprodutivas é um processo complexo que se correlaciona com o controle do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, aos mecanismos de *feedbacks* entre neurônios e células secretoras e a capacidade dos tecidos-alvo para detectar alterações nas concentrações de hormônios circulantes envolvidos na reprodução. Esse sistema depende dos fluxos de sinais endócrinos para a comunicação entre seus componentes (BENITES, 2002).

Todos os segmentos do trato reprodutor da fêmea canina sofrem transformações estruturais, bioquímicas e funcionais em cada fase do ciclo estral, assim como quando acometidos por alguma enfermidade.

O estudo aprofundado da fisiologia da reprodução da espécie canina tem sido cada vez mais realizado, visando utilização deste modelo experimental para estudo em humanos, preservação de material genético de diversas outras espécies, como canídeos selvagens (FELDMAN & NELSON, 2004), cruzamentos intra e inter-racial para seleção de características desejáveis, e recuperação de material genético de fêmeas com importantes afecções no sistema reprodutor (HISHINUMA et al., 2004), na procura de diagnósticos precoces, melhores tratamentos e prognósticos favoráveis dessas enfermidades.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Embriologia do aparelho reprodutor feminino

Durante a fase de desenvolvimento embrionário, duas cristas germinativas originadas do mesoderma intermediário e localizadas na parte dorsal da cavidade pélvica, dão origem ao sistema reprodutivo fetal que, nesta fase, apresenta a condição de bissexualidade embrionária, podendo diferenciar-se em sistema masculino ou feminino (PALHANO et al., 2003; HAFEZ & HAFEZ, 2004). Nesta fase, o sistema reprodutivo é constituído de dois pares de ductos; os ductos de Müller ou paramesonéfricos, base para a formação do trato reprodutor na fêmea, e os ductos de Wolff ou mesonéfricos, que formarão o trato reprodutor masculino, duas gônadas não diferenciadas sexualmente, um *sinus* urogenital, um tubérculo urogenital e pregas vestibulares (PALHANO et al., 2003; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Na fêmea, os ductos de Müller desenvolvem-se em um sistema ductogonadal e os de Wolff sofrem atrofia. Os ductos de Müller fundem-se caudalmente para dar origem ao útero, à cervix e à porção anterior da vagina. O oviduto torna-se sinuoso e adquire epitélio diferenciado e fímbrias logo antes do nascimento. O desenvolvimento dos ductos de Müller, após estágio de bissexualidade é independente de ação hormonal, sendo este ducto capaz de crescimento autônomo, de espiralar-se e de diferenciar seu epitélio (HAFEZ & HAFEZ, 2004). O *sinus* urogenital dá origem ao vestíbulo e uretra. As pregas de pele que margeiam o *sinus* formam os lábios vulvares e o tubérculo genital dá origem ao clitóris (PALHANO et al., 2003; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O sexo do feto depende de genes herdados, da gonadogênese e da formação e maturação dos órgãos reprodutores acessórios. A expressão do sexo genético é um processo de desenvolvimento que depende do funcionamento das gônadas fetais e, ocasionalmente, da atividade do córtex adrenal (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A organização final do indivíduo em relação ao sexo ocorre com a diferenciação do hipotálamo. A exposição do hipotálamo aos androgênios nas proximidades do nascimento dá origem ao hipotálamo do tipo macho. A conversão de androgênios em estrogênios é essencial para que ocorra a masculinização, mediada por enzimas no tecido neural. Na ausência de androgênios, o hipotálamo organiza-se de modo feminino (DAVIDSON & STABENFELDT, 1999).

O conceito fundamental de organização do sistema reprodutor em relação ao genótipo é que o sistema feminino é organizado na ausência de testículos. Um indivíduo macho deve ter a intervenção ativa dos testículos através da produção de androgênios e de enzimas teciduais apropriadas no interior da genitália interna para conversão em androgênios mais potentes e, no interior do hipotálamo para conversão em estrogênios (DAVIDSON & STABENFELDT, 1999).

As células germinativas primordiais têm origem extragonadal e migram do saco vitelínico mesentérico para as cristas genitais (BANKS, 1992, DAVIDSON & STABENFELDT, 1999; HAFEZ & HAFEZ, 2004). Essas células germinativas primordiais povoam os cordões sexuais que se formam na região cortical das gônadas embrionárias a partir da proliferação de célula do epitélio celômico da crista germinal. Os cordões sexuais contribuem com células inicialmente conhecidas como células foliculares e depois como células da granulosa, que envolvem imediatamente o ovócito. O mesênquima da crista genital contribui com células que se transformarão na teca. A estrutura inteira recebe o nome de folículo, que inclui ovócito, a granulosa e as células da teca (DAVIDSON & STABENFELDT, 1999). Todos os óvulos originam-se da população original de células germinativas da crista genital. As células foliculares que circundam o ovócito desenvolvem-se da camada subjacente do epitélio germinativo, enquanto que as células endócrinas, células da teca e intersticiais, originam-se da medula ovariana (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Ao nascimento uma camada de células foliculares circunda os ovócitos primários no ovário para formar os folículos primordiais. De início, estes estão espalhados pelo ovário, porém, no recém-nascido os folículos primordiais

localizam-se na zona cortical periférica, debaixo da túnica albugínea e circundando a medula vascular (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

## **2.2 Anatomia e histologia do trato reprodutor feminino**

Os órgãos reprodutores das fêmeas caninas incluem gônadas femininas pares, os ovários, que desempenham funções endócrinas de produção hormonal e funções exócrinas de produção de gametas femininos (óvulos); tubas uterinas pares, que capturam os óvulos em sua liberação a partir dos ovários e os conduzem para os cornos uterinos, transportam espermatozoides e promovem condições adequadas para que a fertilização ocorra em seu interior; útero, que possui função de albergar conceito, promovendo nutrição, proteção e formação da placenta, função de transporte e seleção espermática, controle do ciclo estral e mecânica do parto; cérvix, vagina, vulva e glândula mamária (DYCE et al., 2004, HAFEZ & HAFEZ, 2004).

### **2.2.1 Ovários**

Os ovários são estruturas pares constituindo-se na contraparte feminina dos testículos (BANKS, 1992). Possui funções endócrinas, como produção de hormônios, e funções exócrinas, relacionadas à gametogênese (PALHANO et al., 2003). A forma e o tamanho das gônadas variam de acordo com a espécie animal e fase do ciclo estral (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O ovário é uma estrutura maciça, elipsóide e irregular devido à projeção da superfície de grandes folículos e corpos lúteos (DYCE et al., 2004). Localizam-se próximos ou em contato com os pólos caudais dos rins. Em conformidade com a posição assimétrica dos rins, o ovário esquerdo situa-se mais caudal quando comparado ao ovário direito (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Cortes transversais do ovário revelaram presença de duas zonas; zona central denominada porção medular, e zona periférica denominada córtex.

A superfície do córtex é revestida de camada única de epitélio cúbico simples (ECS) em sua maior extensão ou pavimentoso em algumas regiões, denominada erroneamente de epitélio germinativo (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Abaixo do “epitélio germinativo” há uma camada de tecido conjuntivo denso avascular, rico em células pequenas distribuídas entre as fibras colágenas, cujas fibras colágenas correm paralelas à superfície ovariana, denominada túnica albugínea (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008), responsável pela cor esbranquiçada do ovário (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Abaixo da túnica albugínea, há uma região cortical, constituída de células fusiformes semelhantes a fibroblastos, dispostos em um arranjo característico, formando redemoinhos. Estes fibroblastos respondem aos estímulos hormonais de um modo diferente dos fibroblastos de outras regiões do organismo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). A região cortical (estroma) é composta de fibras colágenas delgadas, substância fundamental, feixes de células musculares lisas, numerosos folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, e corpo lúteo, de acordo com a fase do ciclo estral. No córtex encontram-se as glândulas intersticiais, bem desenvolvidas, composta de cordões de células epitelióides, onde predominam os folículos ovarianos que contêm ovócitos (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). O córtex possui numerosos vasos linfáticos que estão intimamente ligados à teca externa dos folículos em desenvolvimento. Os vasos coalescem, passam radialmente pela medula, saem pelo hilo e drenam para os linfonodos lombares (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Os folículos primordiais, localizados principalmente abaixo da túnica albugínea, possuem um oócito primário, célula volumosa com núcleo grande,

nucléolo esférico e bem evidente, envolvido por uma camada única de células achatadas, denominadas células foliculares escamosas simples. Uma lâmina basal separa as células foliculares do estroma ovariano (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Os folículos primários consistem de um oócito de maior tamanho, circundado por uma camada de células foliculares de formato cubóide. Os folículos primários possuem zona pelúcida entre oócito e as células foliculares. A proliferação de células foliculares resulta na formação de um folículo multilaminar, denominado folículo primário tardio. As células foliculares são agora denominadas de células da granulosa, e as várias camadas de células da granulosa são denominadas de zona granulosa. Uma camada de células fusiformes semelhantes á fibroblastos do estroma ovariano formam uma camada ao redor do folículo, denominada teca folicular, separada das células foliculares por uma membrana basal (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Os folículos secundários apresentam maior zona granulosa, com maior número de camadas de células da granulosa e cavidades denominadas antro folicular, preenchido por fluido folicular. O oócito localiza-se em uma área espessa da zona granulosa, denominada de *cumulus oophorus*. A teca folicular se prolifera, dividindo-se em duas camadas; teca interna, composta de células arredondadas; e teca externa, constituída de células fusiformes. Os folículos de Graaf ou folículos terciários possuem oócito secundário, o antro folicular aumenta de tamanho e a zona granulosa se torna delgada e forma uma camada de espessura igual ao redor do folículo, que fica preso à zona granulosa por um “pedículo” de células foliculares. O *cumulus oophorus* diminui, deixando o oócito circundado por uma camada de várias células, a corona radiata. O corpo lúteo é constituído de células granulosas luteínicas e células tecais luteínicas (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A parte interna do ovário é composta por uma região medular que contém tecido conjuntivo frouxo com um rico leito vascular (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). A medular localiza-se na parte central do ovário, é pequena, ricamente vascularizada e constituída por tecido conjuntivo frouxo, pobre em células e rico em fibras elásticas. Encontra-se na porção medular uma estrutura denominada rede ovariana revestida de epitélio cubóide. O hilo, localizado na medular, constitui-se de tecido conjuntivo e escassos feixes de células musculares lisas e células hílares (grupos de células epitelióides). Os vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos do ovário ingressam na medular pelo hilo. As artérias possuem diâmetro relativamente grande, emitindo ramificações radiais destinadas ao córtex. O limite entre a região cortical e a medular não é muito distinto (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). A artéria ovariana penetra no órgão pelo hilo e se distribui para a região medular. Ramos da artéria ovariana prosseguem em direção à junção córtico-medular, formando um plexo extenso do qual se originam vasos que irrigam a região cortical. Esses vasos corticais nutrem os elementos corticais, a teca dos folículos em desenvolvimento e em crescimento e os corpos lúteos. Os capilares formam uma trama esférica em torno dos folículos em desenvolvimento. À medida que os corpos lúteos se desenvolvem, ramos derivados do leito capilar periférico formam uma extensa rede capilar no interior do corpo lúteo. O sangue é facilmente desviado para o córtex. A drenagem venosa do córtex é semelhante à irrigação arterial (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

### **2.2.2 Tubas uterinas**

As tubas uterinas são estreitas e geralmente muito tortuosas, é uma estrutura muscular, dividida em três porções; istmo (porção próxima ao corno

uterino), ampola (segmento intermediário) e infundíbulo (próximo ao ovário). O infundíbulo possui forma de um funil de parede delgada e situa-se próximo ao pólo cranial do ovário. A borda livre do funil é “picotada” e os “picotes”, denominados de fímbrias, entram em contato com a superfície do ovário, podendo aderir-se a esta superfície. Um pequeno orifício na profundidade do funil, de localização abdominal, leva à parte tubular mais longa, dividida em dois segmentos semelhantes. O segmento proximal, conhecido como ampola, é seguido pelo istmo, mais contorcido e mais estreito (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A parede da tuba uterina é composta de três camadas; uma camada mucosa; uma espessa camada de musculatura lisa disposta em uma camada circular ou em espiral interna e uma camada longitudinal externa; e uma camada serosa formada de lâmina visceral de peritônio.

A mucosa tem dobras longitudinais, que atingem o centro da tuba uterina, numerosas na ampola, que ficam menores nos segmentos da tuba mais próximos ao útero. A mucosa é formada de um epitélio colunar simples e de uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo. O epitélio contém dois tipos celulares; tipo ciliado e secretor (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). São comuns núcleos extrudados que surgem a partir das células epiteliais (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). O infundíbulo apresenta grande quantidade de células ciliadas e pouca quantidade de células secretoras, o istmo apresenta grande quantidade de células secretoras e pequena quantidade de células ciliadas (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Em mulheres, os cílios se movimentam em direção ao útero, movimentando nesta direção uma película de muco que cobre sua superfície. Este líquido consiste principalmente de produtos das células secretoras, que estão interpostas entre as células ciliadas.



No momento da ovulação, a tuba uterina apresenta movimentação ativa e a extremidade afunilada da ampola, contendo numerosas fímbrias, se coloca perto da superfície do ovário, favorecendo a captação do oócito que foi ovulado. A secreção possui funções nutritivas e protetoras com relação ao oócito, e promove ativação dos espermatozoides (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). A fertilização ocorre na ampola; se a fertilização não ocorrer, o oócito sofre autólise na tuba uterina sem completar a segunda divisão de maturação. A contração de músculo liso e atividade das células ciliadas transportam o oócito ou zigoto ao longo do infundíbulo e do restante da tuba uterina.

É revestida de camada serosa, delgada, constituída de tecido conjuntivo frouxo e recoberta por epitélio cúbico simples ou pavimentoso em algumas regiões. A camada serosa aumenta de espessura à medida que se aproxima do corno uterino, reduzindo a luz do órgão no istmo.

A camada muscular é constituída de células musculares lisas dispostas em dois estratos; estrato interno, denominado camada muscular circular, mais espessa, composta de grande quantidade de células musculares lisas dispostas de forma circular; e estrato externo, denominado camada muscular longitudinal, mais estreita, composta de fibras musculares lisas dispostas longitudinalmente. As fibras musculares em ambas as camadas são entremeadas por tecido conjuntivo frouxo, que se continua com a lâmina própria. A camada muscular, assim como a camada serosa, se torna mais espessa no istmo (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE ET AL., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

### **2.2.3 Corno uterino e corpo do útero**

O útero se situa dorsal ao intestino delgado e consiste de um corpo bem curto a partir do qual divergem dois cornos longos e esguios. O corpo se localiza próximo da margem púbica, mas pode se encontrar em posição abdominal ou pélvica (DYCE et al., 2004).

O corno uterino e corpo do útero são constituídos de três camadas; perimétrio (camada serosa), miométrio (camada muscular lisa) e endométrio (camada mucosa), constituída de epitélio de revestimento mais lâmina própria de tecido conjuntivo. O perimétrio é a camada externa composta de uma delgada camada serosa, constituída de mesotélio e tecido conjuntivo ou, dependendo da porção do órgão, uma camada adventícia, constituída de tecido conjuntivo sem revestimento de mesotélio. As outras camadas uterinas são o miométrio, uma espessa camada de músculo liso, e o endométrio ou mucosa uterina (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE ET AL., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

O miométrio, a camada mais espessa do útero, é composto de pacotes de fibras musculares lisas separadas por tecido conjuntivo, em camada muscular longitudinal, estrato vascular e camada muscular circular. A camada muscular longitudinal externa é composta de fibras musculares lisas (FML) dispostas de maneira circular e poucas fibras musculares lisas dispostas de maneira longitudinal, entremeadas por fibras colágenas e tecido conjuntivo frouxo. O estrato vascular é constituído de fibras musculares lisas dispostas de maneira longitudinal, grande quantidade de vasos sanguíneos e linfáticos. A camada muscular circular interna é composta de fibras musculares longitudinais entremeadas por fibras colágenas (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE ET AL., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Durante a gestação ocorre hiperplasia do miométrio, com aumento do número de células musculares lisas e hipertrofia, que é o aumento destas células. Durante esta fase, as células musculares lisas adquirem características ultra-estruturais de células secretoras de proteínas e sintetizam ativamente colágeno. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008), como ocorre na fase de diestro sem gestação. Após a gestação ocorrem degeneração e redução de algumas células musculares lisas e degradação enzimática de colágeno (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

O endométrio consiste em epitélio e lâmina própria que contém glândulas tubulares simples que podem se ramificar nas porções mais profundas (próximo ao miométrio). As células que revestem a cavidade uterina se organizam em epitélio colunar simples, formado de células ciliadas e células secretoras. O epitélio das glândulas uterinas é semelhante ao epitélio superficial, mas células ciliadas são raras dentro das glândulas. O tecido conjuntivo frouxo da lâmina própria é formado por fibras conjuntivas reticulares, rico em fibroblastos, com abundante matriz extracelular (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE ET AL., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008) e escassos vasos sanguíneos. O tecido conjuntivo da lâmina própria pode ser subdividido em duas camadas; uma camada basal, mais profunda, adjacente ao miométrio, constituída por tecido conjuntivo e porção inicial das glândulas uterinas; e uma camada funcional, formada pelo restante do tecido conjuntivo da lâmina própria, onde se desembocam as glândulas, além do epitélio superficial (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE ET AL., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). A camada funcional sofre mudanças intensas durante o ciclo estral e a camada basal permanece quase inalterada (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Em mulheres, os estrógenos atuam no endométrio induzindo proliferação celular. Durante a fase proliferativa o endométrio é coberto por epitélio colunar simples. As glândulas, formadas por epitélio colunar simples, tomam forma de tubos retilíneos e seu lúmen é estreito. As células epiteliais gradualmente acumulam cisternas de retículo endoplasmático granuloso e o aparelho de Golgi aumenta de tamanho, em preparação para um aumento da sua atividade secretora (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). A fase proliferativa é influenciada pela progesterona secretada pelo corpo lúteo. Atuando sobre glândulas que se desenvolveram pela ação do estrógeno, a progesterona continua estimulando as células glandulares. As células epiteliais começam a acumular glicogênio na porção infranuclear. Em seguida, a quantidade de glicogênio das células diminui, e produtos de secreção dilatam o lúmen das glândulas, que se tornam muito tortuosas. Nesta fase, sob ação da progesterona,

o endométrio alcança sua máxima espessura como resultado do crescimento da mucosa, do acúmulo de secreção e do edema no estroma (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

### **2.3 Mecanismos endócrinos da reprodução na fêmea canina**

O ciclo reprodutivo relaciona-se com vários fenômenos como puberdade, maturidade sexual, e senescência, relacionados com fatores ambientais, genéticos, fisiológicos, hormonais e comportamentais. O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente hormônios hipotalâmicos, pelos esteróides secretados pelos ovários e gonadotrofinas secretadas pela neurohipófise. A regulação desses diversos hormônios durante o ciclo estral requer um balanceamento entre complexas interações hormonais, como modificações nas taxas de síntese, liberação e degradação de vários outros hormônios envolvidos (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O eixo hipotálamo-hipofisário é a unidade funcional de integração dos sistemas nervoso central e endócrino, que regula importantes funções metabólicas, como crescimento, lactação, reprodução e equilíbrio hídrico (RIVERA-GONZALEZ et al., 2002), por meio dos hormônios hipotalâmicos (hormônio liberador de gonadotrofinas – GnRH), hipofisários (hormônio luteinizante – LH e hormônio folículo estimulante – FSH) e gonadais (estradiol - E2, progesterona – P4 e inibina).

O hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) são chamados de gonadotrofinas por estimularem as células no interior dos ovários e testículos (gônadas). As gonadotrofinas são liberadas de maneira pulsátil na circulação sistêmica e atuam nas gônadas regulando a gametogênese e secreção dos estrógenos gonadais (STANISLAUS et al., 1998). A liberação de FSH e LH da hipófise anterior é controlada pelo GnRH, que é secretado pelo hipotálamo em resposta aos baixos níveis de LH ou FSH e sua liberação resulta em aumento na secreção das gonadotrofinas. As concentrações de FSH e LH existentes no

plasma são controladas por *feedback* negativo das gônadas (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O FSH estimula o crescimento e a maturação do folículo ovariano ou folículo de *Graaf*. Este hormônio por si só não causa secreção de estrógenos no ovário, ao contrário, ele necessita da presença do LH para estimular a produção estrogênica (HAFEZ & HAFEZ, 2004). O FSH influencia a produção de estrógeno, fazendo com que as células da granulosa convertam andrógenos, produzidos pela teca sob influência do LH, em estrógenos (FORTUNE et al., 2004). O FSH induz receptores adicionais para o FSH, além de induzir a formação de receptores para o LH, enquanto o LH diminui o número de receptores para FSH na granulosa (STABENFELD & EDQVIST, 1996).

O LH secretado pela adeno-hipófise, é regulado pela P4 e E2 ovarianos (GOODMAN & KARSCH, 1980). Durante a maior parte do ciclo estral, ambos hormônios inibem a secreção de LH por meio de retroalimentação negativa sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário. Níveis tônicos ou basais de LH atuam em conjunto com o FSH no sentido de induzir a secreção de estrógenos do folículo ovariano desenvolvido. O pico préovulatório do LH é responsável pela ruptura da parede folicular e ovulação (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O aumento na concentração de estrógeno provoca aumento na sensibilidade da hipófise anterior ao GnRH, resultando em aumento na liberação de gonadotrofinas. A progesterona diminui a sensibilidade da hipófise anterior ao GnRH e a concentração de LH e FSH diminuem. Essas influências, particularmente do estrógeno, dependem da elevação gradual das concentrações de estrógenos durante um período de tempo, que resulta no pico pré-ovulatório de LH. Quando a concentração de estrógenos se encontra em níveis basais, com curta duração, as secreções de LH e FSH são suprimidas (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O GnRH é um decapeptídeo sintetizado por células neuroendócrinas na área pré-óptica do hipotálamo e após ser liberado sob a forma de pulsos (Clarke,

1988) atinge a adenohipófise através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário (STANISLAUS et al., 1998).

Os ovários são responsáveis pela produção dos oócitos (gametogênese) e esteróides sexuais femininos (GONZÁLEZ, 2002). Os estrógenos são produzidos durante o desenvolvimento folicular por células secretoras de esteróides localizadas entre os fibroblastos da teca interna; no decorrer da fase lútea são produzidas pelo corpo lúteo juntamente com a progesterona. A secreção estrogênica do ovário é controlada pelos hormônios hipofisários. No útero, a ação do estrógeno foi correlacionada à formação de um complexo estrogênico-cromatina nos núcleos celulares, aumentando a síntese de RNA induzidas por esses hormônios, que são dependentes de síntese protéica anterior (HAFEZ & HAFEZ, 2004). O mecanismo de ação do estrogênio no útero é semelhante ao seu mecanismo de ação em outros tecidos. São produzidos pelos ovários, placenta, e córtex adrenal (GONZÁLEZ, 2002).

Os estrógenos,  $17\beta$ -estradiol e estrona predominam em animais domésticos não-gestantes e gestantes, respectivamente, e suas principais funções é induzir a proliferação celular e o crescimento de tecidos relacionados à reprodução. As respostas teciduais induzidas pelos estrógenos incluem a estimulação do crescimento glandular endometrial, estimulação do crescimento de ductos na glândula mamária, aumento na atividade secretora dos ductos uterinos, indução da receptividade sexual, regulação da secreção de hormônio lutenizante (LH) pela glândula pituitária anterior, possível regulação da liberação de  $PGF2\alpha$  pelo útero não-gravídico e gravídico e união precoce da epífise com o corpo dos ossos longos, cessando o crescimento desses ossos, anabolismo protéico e atividade epiteliotrófica. O efeito anabólico do estrógeno sobre as proteínas é menos evidente que aquele associado à testosterona. Está associado, mais especificamente, aos órgãos sexuais do que a um efeito generalizado. A função epiteliotrófica manifesta-se no útero, quando o epitélio da vagina se prolifera com maior intensidade (GONZÁLEZ, 2002).

O progesterona (P4), como os estrógenos, é um hormônio esteróide produzido pelo corpo lúteo (CL) do ovário, placenta e córtex adrenal. As atividades associadas à progesterona são realizadas em associação aos estrógenos, e normalmente requerem a prévia atuação de estrógenos. As funções da progesterona incluem a promoção do crescimento glandular endometrial, estimulação da atividade secretória do oviduto e glândulas endometriais para produzir nutrientes para o desenvolvimento do embrião antes da implantação, promoção do crescimento lóbulo alveolar na glândula mamária, prevenção na contratilidade do útero durante a gestação e regulação da secreção de gonadotrofinas (GONZÁLEZ, 2002).

Outros hormônios como TSH, prolactina, relaxina, PGF2 $\alpha$  e ocitocina exercem influência sobre o sistema reprodutor.

## **2.4 Puberdade**

Puberdade é definida como o período no qual a capacidade reprodutiva é atingida, reconhecida com o início do primeiro estro nas fêmeas caninas (JOHNSTON et al., 2001), quando são capazes de liberar gametas e manifestar características de comportamento sexual completo, como monta e cópula, resultado de um ajuste gradativo entre o aumento da atividade gonadotrófica e a habilidade das gônadas em assumir simultaneamente a esteroidogênese e a gametogênese (JOHNSTON et al., 2001).

Durante os primeiros seis meses de vida em filhotes da espécie canina, ocorre o desenvolvimento e estabelecimento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, que é responsável pela regulação hormonal da fase reprodutiva dos animais. Na fase pré-puberdade os órgãos sexuais desses animais ainda não atingiram sua completa maturação funcional, e os níveis de gonadotrofinas permanecem baixos (HAFEZ & HAFEZ, 2004). No início da puberdade a amplitude e frequência elevadas dos impulsos periódicos de gonadotrofinas, resultante dos esteróides sexuais e do aumento na resposta de LH (HAFEZ &

HAFEZ, 2004). O hipotálamo começa a liberação pulsátil do GnRH. Os hormônios esteróides sexuais (progéstágenos, andrógenos e estrógenos) são sintetizados dentro dos folículos ovarianos, sob influência do LH e FSH. Os andrógenos (androstenediona e testosterona) são produtos intermediários na síntese de estrogênios e acredita-se que esta transformação seja um dos mecanismos responsáveis pelo comportamento passivo característico do estro. No entanto, diferentemente de outras espécies, o LH não é essencial para a integridade funcional e morfológica do corpo lúteo, e aparece mais como um hormônio luteotrófico facultativo, estimulando direta ou indiretamente a secreção de progesterona. Nesta espécie, atualmente a prolactina tem sido implicada como o principal hormônio luteotrófico (MARTINS, 2007).

A fase de transição entre a infância e a puberdade varia conforme raça, peso e idade dos animais. Fêmeas caninas iniciam a puberdade quando atingem dois terços do seu peso adulto final. Cães de pequeno porte atingem a puberdade aos 6 e 8 meses de idade, de porte médio em 8 a 12 meses de idade e de grande porte em 12 a 20 meses de idade (JOHNSTON et al., 2001).

Padrões reduzidos ou incoerentes são encontrados nas concentrações séricas de estradiol, LH e progesterona em fêmeas púberes (JOHNSTON et al., 2001).

## **2.5 Ciclo estral**

O ciclo estral é o ritmo funcional dos órgãos reprodutivos femininos, definido de acordo com modificações cíclicas na fisiologia e morfologia dos órgãos genitais, características comportamentais, citológicas e endócrinas, que se estabelece a partir da puberdade (JOHNSTON et al., 2001; ANTONIOLLI, 2002; OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2008).

As fêmeas caninas domésticas apresentam dois ciclos estrais por ano, podendo variar de um a quatro, dependendo da raça ou de características individuais dos animais (JOHNSTON et al., 2001). Por isso, são consideradas



monoéstricas não sazonais, podendo apresentar ciclos em qualquer época do ano (SOKOLOWSKI, 1977). No estro, dia zero do ciclo estral, é o período da fase reprodutiva do animal no qual a fêmea apresenta sinais de receptividade sexual, seguida de ovulação (STABENFELDT & EDQVIST, 1996; ALVES et al., 2003).

O ciclo estral da fêmea canina possui características distintas de outras espécies. A cadela é monocíclica com sua fase luteínica considerada semelhante em indivíduos gestantes e não gestantes, apresentando período de vários meses de quiescência (anestro) até o surgimento de novo ciclo (CONCANNON et al., 1989). Os estádios e suas fases funcionais correspondentes são o proestro que corresponde à fase folicular, estro e diestro que representam a fase luteínica e o anestro que é descrito como uma fase de quiescência (ETTINGER, 1992). A ocorrência de estro (receptividade sexual) na fase luteínica é característico da cadela, pois este inicia-se com o declínio do estrógeno e aumento da progesterona associado a uma onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH), não observado em outras espécies (CONCANNON et al., 1989).

### **2.5.1 Proestro**

A fase de proestro é definida clinicamente como o estágio do ciclo responsável por mudanças externas, que pode ter uma duração de três a 21 dias, com média de nove dias. Nesta fase, a fêmea canina apresenta vulva edemaciada e hipertrofiada, edema na região perineal, cérvix dilatada, mucosa vaginal congesta, corrimento vaginal sero-sanguinolento aquoso (FELDMAN & NELSON, 2004), resultante de diapedese eritrocitária e ruptura de capilares subepiteliais, devido às rápidas mudanças que ocorrem no endométrio em resposta à secreção folicular de estrógeno, o endométrio encontra-se espessado e há aumento na atividade glandular e no crescimento dos ductos e túbulos da glândula mamária. Essas alterações são causadas pelo aumento na concentração de estrógeno nesta fase do ciclo estral. A manifestação comportamental da fêmea caracteriza-se pela atração do macho com recusa à cobertura, caracterizada por

comportamento de fuga passiva, curvatura ipsolateral direita ou esquerda da vulva, e desvio contralateral ou vertical da cauda, em resposta ao toque na fêmea (JOHNSTON et al., 2001; FELDMAN & NELSON, 2004).

O proestro representa a fase folicular, caracterizada por desenvolvimento folicular ovariano, na qual a condição reprodutiva é predominantemente determinada pelos níveis crescentes de estradiol produzido pelas células granulosas dos folículos ovarianos, até o amadurecimento e sua liberação do ovário (CONCANNON et al., 1989). Nesta fase os valores hormonais são: 0,2 a 2 ng/mL de progesterona, 50 a 100 pg/mL de estradiol, 100 ng/mL de FSH, 8,5 ng/mL de LH, 2 ng/mL de PRL e 0,3 a 1 ng/mL de testosterona (JOHNSTON et al., 2001). O nível máximo de estradiol sérico ocorre em 24 a 48 horas antes do término do proestro e tem duração de dois dias, precedendo o pico pré-ovulatório de LH (VALTONEN & JALKANEN, 1993), retornando progressivamente às concentrações basais (15pg/mL) durante os próximos 5 a 20 dias (ETTINGER, 1992). No início do proestro observa-se uma série de pequenas, porém potentes, ondas de LH (FELDMAN & NELSON, 2004), retornando à concentração basal em seguida, e elevando-se em amplitude e frequência ao final do período, até alcançar um pico em aproximadamente 48 horas antes da ovulação (ETTINGER, 1992). Esta onda pré-ovulatória de LH tem uma duração de 24 a 72 horas (CONCANNON et al., 1989) e é mais longa que a observada na maioria das outras espécies (STABENFELDT & SHILLE, 1977).

### **2.5.2 Estro**

A fase do estro, com duração média de uma semana, podendo variar de 3 a 21 dias, é caracterizada pela receptividade sexual e aumento crescente das concentrações plasmáticas de progesterona e declínio da concentração de estrógeno circulante, (CONCANNON et al., 1989; FELDMAN & NELSON, 2004), devido à luteinização das células da granulosa dos folículos maduros, que passam a produzir progesterona. A queda nos valores de estradiol sérico e elevação de

progesterona resultam em *feedback* positivo sobre o hipotálamo e hipófise, resultando na secreção de FSH e onda pré-ovulatória de LH (FELDMAN & NELSON, 2004).

A fêmea manifesta edema de vulva, mucosa vaginal ligeiramente hipocorada, corrimento vaginal de coloração amarelo palha ou sanguinolento e atração do macho com aceitação de cobertura. A aceitação é caracterizada pela lateralização da cauda e apresentação da genitália externa para o macho (FELDMAN & NELSON, 2004). O endométrio encontra-se nesta fase menos edemaciado (ALLEN, 1995).

Na maioria dos ciclos, o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) ocorre um dia antes da transição comportamental do proestro ao estro, embora o início do estro e a primeira cobertura possam ocorrer 2 ou 3 dias antes ou 4 a 5 dias depois do pico de LH (CONCANNON et al., 1989). A ovulação, que é espontânea na fêmea canina, ocorre 24 a 72 horas após a onda de LH (OLSON & NETT, 1986; ETTINGER, 1992; FELDMAN & NELSON, 2004), entre o segundo ou terceiro dia do estro (TSUTSUI, 1989), 24 a 48 horas após a aceitação do macho pela fêmea (HOLST & PHEMISTER, 1971). A fêmea canina ovula oócitos primários, e a primeira divisão meiótica se completa no oviduto dentro de três dias após a ovulação (ETTINGER, 1992; BYSTED, 1999; FARSTAD, 2000; FELDMAN & NELSON, 2004). Altos índices de fertilidade estão associados a coberturas ocorridas entre os dias zero a cinco após o pico de LH (HOFFMANN et al., 1996; FELDMAN & NELSON, 2004). No momento da onda pré-ovulatória de LH, a concentração de progesterona encontra-se em torno de 2 a 4 ng/mL, tal elevação dos níveis séricos de P4 é responsável pelo comportamento receptivo da fêmea ao macho (FELDMAN & NELSON, 2004).

Nesta fase os valores séricos de progesterona estão compreendidos entre 5 e 10 ng/mL, 5 a 200 pg/mL de estradiol, 200 ng/mL de FSH, 8 a 50 ng/mL de LH, 2 ng/mL de PRL e valores inferiores de 0,1 ng/mL de testosterona (JOHNSTON et al., 2001).

### 2.5.3 Diestro

O diestro representa a fase lútea do ciclo estral, quando a influência hormonal dominante é exercida pela progesterona, produzida pelos corpos lúteos (DYCE et al., 2004). Tem duração média 75 dias, podendo variar entre 60 a 90 dias (SILVA, 1995).

O diestro é caracterizado por redução progressiva do edema vulvar, permanecendo dobras discretas na vulva, ausência de secreções vaginais, mucosa vaginal hipocorada, ausência de atração dos machos e desenvolvimento da glândula mamária, com presença ou ausência de secreção láctea.

A progesterona durante o diestro atinge um pico máximo de 15 a 60 ng/mL duas a três semanas após o início deste estágio, o qual persiste por uma a duas semanas, declinando gradualmente até atingir valores basais no final deste período, enquanto os outros hormônios encontram-se em concentrações basais (ETTINGER, 1992). O útero responde ao aumento da concentração de progesterona mantendo a estrutura glandular e vascularização adequadas para a gestação. A duração do diestro, baseada na função lútea, é similar para fêmeas gestantes e não gestantes (OLSON & NETT, 1986).

O início da formação dos corpos lúteos se dá através da luteinização folicular pré-ovulatória, que se completa após as ovulações, desencadeadas pelo pico pré-ovulatório de LH. A duração do diestro varia conforme a classificação utilizada; duração de dois meses, considerando-se semelhança ao período gestacional; dois ou três meses em função do desenvolvimento da glândula mamária associado à pseudogestação, caracterizada ou não por sinais clínicos; duração de 80 dias considerando-se o decréscimo da progesterona a valores séricos de 1 ng/mL; duração de 100 a 160 dias, considerando-se redução nos valores séricos de progesterona a valores basais de anestro, inferiores a 0,5ng/mL; ou duração de 120 a 140 dias, considerando-se o período de efetividade da progesterona no miométrio (CONCANNON & DI GREGÓRIO, 1986).

Os valores séricos de progesterona durante a fase de diestro compreendem de 10 a 50 ng/mL, 5 a 20 ng/mL de estradiol, 100 ng/mL de FSH, 8,5 ng/mL de LH, 3 a 4 ng/mL de PRL e valores inferiores a 0,1 ng/mL de testosterona (JOHNSTON et al., 2001).

#### **2.5.4 Anestro**

O anestro é a fase de quiescência reprodutiva. Em espécies monoéstricas, como a espécie canina, um período longo de inatividade sexual ocorre antes que o ciclo se renove (DYCE et al., 2004), associado a baixas concentrações circulantes de P4, estradiol e LH (JEFFCOATE, 1992), e altas concentrações de FSH (OLSON et al., 1982). É a fase do ciclo estral caracterizada por intervalo entre o final da fase luteal na fêmea não-gestante ou recém-parida, e o início da próxima fase de proestro (JEFFCOATE, 1998), ou é considerada a fase de involução uterina, que se completa aos 120 dias do ciclo sem gestação e aos 140 dias do ciclo com gestação, podendo explicar o longo período de intervalo interestril em fêmeas caninas normais (FELDMAN & NELSON, 2004).

Não há diferenças clínicas aparentes entre um animal em final de diestro não gestante e um animal em anestro. Possui duração de um a seis meses, com média de 125 dias (FELDMAN & NELSON, 2004).

Mudanças transcricionais ocorrem nos receptores do FSH no anestro, impedindo a resposta a estímulos gonadotróficos (MCBRIDE et al., 2001). De acordo com KOOISTRA & OKKENS (2001) a progressão do início ao final do anestro está associada com aumento da secreção de FSH, sem aumento concomitante de LH, indicando que o aumento de FSH deve ser considerado como o evento crítico para o início da foliculogênese e conseqüentemente término do anestro. Em outros estudos envolvendo os aspectos endocrinológicos do anestro em cadelas, foi observada ausência de liberação ou circulação insuficiente de gonadotrofinas, e responsividade reduzida dos ovários às gonadotrofinas

provocada pela prolactina, sugerindo que este hormônio exerça papel inibidor sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano (JEFFCOATE, 1993).

No início e meio do anestro as concentrações de estradiol e progesterona encontram-se basais, havendo elevação do estradiol no final desta fase. A concentração de FSH encontra-se basal no início e meio do anestro, apresentando aumento no final deste período. Um discreto aumento periódico de LH pode ser detectado durante o anestro, apresentando maior intensidade no final desta fase (ETTINGER, 1992; KOOISTRA et al., 1999).

Os valores séricos de progesterona são inferiores a 0,1 ng/mL, 5 a 20 ng/mL de estradiol, 300 ng/mL de FSH, 8,5 ng/mL de LH, 2 ng/mL de PRL e valores inferiores a 0,1 ng/mL de testosterona (JOHNSTON et al., 2001).

## **2.6 Citologia Vaginal**

As fases do ciclo estral podem ser determinadas por macroscopia vulvar e colposcopia associadas à citologia vaginal, a qual se baseia nas alterações quantitativas e qualitativas das células, com a finalidade de detectar a fase do ciclo estral, determinar a função folicular ovariana, a presença de cistos foliculares e avaliação indireta dos níveis de estrógenos (CASTRO et al., 1996; FELDMAN & NELSON, 2004). A técnica de citologia vaginal é utilizada em associação à observação dos sinais clínicos e anamnese associados ao sistema reprodutor (OLSON et al., 1984, VANNUCCHI et al., 1997).

O epitélio vaginal é classificado histologicamente como epitélio estratificado pavimentoso, particularmente sensível às alterações hormonais (MIALOT, 1984). A mucosa vaginal e as células epiteliais vaginais sofrem alterações morfológicas sob a ação das concentrações crescentes de estrógenos, responsáveis por estimular a proliferação do epitélio vaginal, que evolui de uma espessura de poucas camadas celulares no anestro para uma espessura de 20 a 30 (até 100-150) camadas de células no final do proestro. O “afastamento” das células epiteliais da membrana basal epitelial acarreta um processo degenerativo de

morte celular associado à queratinização citoplasmática, decorrente do afastamento das células superficiais do aporte sanguíneo. A variação na quantidade de células superficiais (índice de queratinização celular) ao longo de esfregaços vaginais pode ser utilizada na determinação da fase do ciclo estral (VANNUCCHI et al., 1997).

As células parabasais são as células vaginais mais saudáveis e de menor tamanho, arredondadas ou ligeiramente ovais. Possuem grande núcleo vesiculado e pouca quantidade de citoplasma. São as células que estão em íntimo contato com o aporte sanguíneo (FELDMAN & NELSON, 2004).

As células intermediárias podem atingir o dobro do tamanho das células parabasais. Possuem aspecto arredondado ou ovalado, núcleo pequeno e citoplasma amplo. Esta alteração da morfologia é o primeiro sinal de morte celular (FELDMAN & NELSON, 2004).

As células superficiais são células mortas que revestem a parede vaginal das fêmeas caninas em estro. São as maiores células e possuem bordas citoplasmáticas angulares, planas, nítidas e núcleos geralmente picnóticos quando presentes (FELDMAN & NELSON, 2004).

As células escamosas anucleares são células vaginais grandes, mortas, irregulares, sem núcleo visível, representando o final do processo iniciado com as células parabasais. A morte celular ocorre devido à falta de suprimento sanguíneo na parede vaginal que se encontra espessada por ação do estrógeno sérico (FELDMAN & NELSON, 2004).

A citologia vaginal da fase de proestro é caracterizada pela presença de neutrófilos, hemácias, células parabasais, intermediárias, e superficiais. No final do proestro os neutrófilos tendem a desaparecer e aumentam o número de células intermediárias. As hemácias podem estar abundantes ou até mesmo ausentes. A análise quantitativa e qualitativa das células varia de acordo com o estágio da fase de proestro. O início da fase é caracterizado por um esfregaço vaginal com variável número de células sanguíneas, numerosas células parabasais e intermediárias. Neutrófilos são comumente encontrados, mas não

abundantemente, e bactérias podem ser visualizadas em pequenas ou grandes quantidades. O fundo do esfregaço é aparentemente sujo, devido à presença de secreções cervicais e vaginais viscosas que se coram facilmente (JOHNSTON et al., 2001). Na fase intermediária do proestro a primeira evidência do efeito da ação contínua do estrógeno na citologia vaginal é o desaparecimento dos neutrófilos, visto que tais células neste momento não conseguem atravessar a espessa parede de células. As células parabasais e intermediárias pequenas são substituídas por células intermediárias grandes e por células superficiais ou intermediárias. Eritrócitos podem ou não estar presentes, e o fundo pode continuar sujo ou apresentar-se claro (JOHNSTON et al., 2001). A fase final do proestro é caracterizada por esfregaço com ausência total de neutrófilos, presença variável de células sanguíneas, e fundo claro. Mais de 80% das células são superficiais com núcleos picnóticos ou anucleadas (JOHNSTON et al., 2001).

No estro a citologia apresenta poucas hemácias, 90% de células superficiais, acidófilas e angulares e quantidade considerável de bactérias. O fundo do esfregaço é claro e não apresenta detritos celulares. O núcleo das células é picnótico, pequeno em relação ao tamanho das células, podendo muitas vezes estar ausentes. As células tendem a agrupar-se (JOHNSTON et al., 2001). Eritrócitos podem estar presentes em pequena quantidade e alguns esfregaços estrais podem apresentar grande quantidade de bactérias. Neutrófilos não são encontrados nesta fase do ciclo estral em condições normais (BACHA & BACHA, 2003).

Durante o diestro ocorre uma alteração significativa no número de tipos celulares epiteliais (BACHA & BACHA, 2003). A citologia vaginal característica da fase de diestro apresenta neutrófilos, células parabasais, 50% de células intermediárias e 20% de células superficiais (JOHNSTON et al., 2001). Como eritrócitos podem ser encontrados em esfregaços de fêmeas caninas no início da fase de diestro, não é possível distinguir um proestro de um diestro com base em um único esfregaço (BACHA & BACHA, 2003).



No anestro a citologia vaginal é caracterizada pela predominância de células parabasais, pequenas e redondas, nucleadas e basófilas, e poucas células intermediárias. O fundo do esfregaço apresenta-se mucoso (JOHNSTON et al., 2001). Neutrófilos e bactérias podem estar presentes em pequena quantidade (BACHA & BACHA, 2003).

## **2.7 Piometra**

A piometra é uma das afecções mais comuns na rotina clínica de pequenos animais, principalmente em fêmeas caninas (NISKANEM & THRUSFIELD, 1998). Sua importância está relacionada à frequência e gravidade que ocorrem e seu estabelecimento é resultado da influência hormonal, fatores de virulência e toxinas secretadas pelos agentes infecciosos e capacidade individual do sistema imune em combater essas infecções (DE BOSSCHERE et al., 2002; WEISS et al., 2004; JONES et al., 2007). Em fêmeas caninas com endotoxemia e efeitos sépticos da piometra, vários sistemas e funções orgânicas, incluindo homeostasia, são prejudicados (TANJA et al., 2006). A afecção, que progride para endotoxemia, sepse, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, apresenta grande risco de morte, morbidade de 5 a 8% (NELSON & COUTO, 1998) e taxa de mortalidade de 4 a 20% (NELSON & COUTO, 1998; BRADY & OTTO 2001; EGENVALL et al., 2001; HAGMAN et al., 2006). Quando a sepse está associada à insuficiência renal aguda, a taxa de mortalidade é de 62%, segundo BEHREND et al. (1996) e de 76% segundo VADEN et al. (1995).

A incidência é alta, EGENVALL et al. (2001) afirma que 25% das fêmeas caninas apresentam piometra antes dos 10 anos de idade. A afecção pode se manifestar em qualquer idade, mas apresenta maior incidência em animais de meia-idade ou idosos. NISKANEM & THRUSFIELD (1998) afirmam que 66% das fêmeas acometidas por piometra possuem idade superior a nove anos, BOSSCHERE et al. (2002) afirma que a idade dos animais acometidos é de aproximadamente  $8,1 \pm 2,8$  anos. Animais jovens podem apresentar essa afecção

decorrente de tratamentos hormonais (MARTINS et al., 2002). Na Suécia, a incidência é de 23 a 24% (FRANSSON & RAGLE, 2003).

A piometra se distingue na patogenia, sinais, tratamento e prognóstico da metrite pós-parto e mucometra (VERSTEGEN & DHALIWAL, 2008). Uma associação entre piometra e a afecção uterina mais comum em fêmeas caninas, a hiperplasia endometrial cística, foi estabelecida. O processo degenerativo progressivo desenvolvido pela hiperplasia endometrial cística, decorrente de distensão glandular e fibrose, é proposto como lesão inicial da piometra em fêmeas caninas, mediada por progesterona e agravada por estrógenos (BARRAU et al., 1975; DE BOSSCHERE et al., 2001). NOMURA (1994) E NOMURA & NISHIDA (1998) afirmam que a sequência determinada por progesterona resultando em hiperplasia endometrial cística, e hiperplasia endometrial cística resultando em piometra, pode não estar correta, e bactérias podem ser o agente causador inicial. A infecção subclínica do útero ou do endométrio causada por corpos estranhos no final do estro ou durante primeira metade do diestro proporciona estímulo para hipertrofia e hiperplasia excessiva do endométrio, como observado no momento da implantação do embrião. As secreções resultantes da proliferação glandular endometrial epitelial e luminal podem iniciar o desenvolvimento de piometra ou mucometra, dependendo se o agente promotor é de origem bacteriana ou não, respectivamente (DE BOSSCHERE et al., 2001). Essa hipótese é suportada pela observação da piometra em animais jovens sem histórico de terapia hormonal, onde a hiperplasia endometrial cística não estava presente (DE BOSSCHERE et al., 2001).

A piometra é uma inflamação supurativa e degenerativa do endométrio, associada ou não ao miométrio, aguda ou crônica, caracterizada por acúmulo de exsudato nas glândulas endometriais e lúmen uterino (FIENI, 2006). A resposta exagerada do endométrio à exposição crônica de progesterona endógena ou exógena, somadas aos efeitos do estrógeno endógeno ou exógeno, permite o acúmulo de secreções uterinas glandulares (VOORWALD et al., 2009), desenvolvimento de criptas, cistos e redução da resposta imune local devido a

degeneração tecidual (NOMURA & NISHIDA, 1998; DE BOSSCHERE et al., 2001), que se repetem nos sucessivos ciclos reprodutivos, resultando em uma evolução local crônica, ocasionando comprometimento progressivo do local (FIENI, 2006), proporcionando excelentes condições para crescimento bacteriano oriundo da flora vaginal, trato urinário ou fezes, resultando em bacteremia, afecção hepatorenal e toxemia (TONIOLLO et al., 2000; WEISS et al., 2004; FIENI, 2006; JONES et al., 2007; VOORWALD et al., 2009).

Elevação das concentrações de estrógenos é responsável pelo aumento da taxa de migração de neutrófilos para o lúmen uterino promovendo efeito bactericida, relaxamento e dilatação da cérvix, aumento da intensidade de contração do miométrio promovendo drenagem do conteúdo uterino durante a fase de proestro e início de estro (FIENI, 2006), entretanto o estrógeno é responsável pela elevação da sensibilidade dos receptores uterinos à progesterona, edema, aumento da vascularização e proliferação endometrial, resultando em hiperplasia do endométrio com o surgimento de criptas. Tais alterações associadas às altas concentrações de progesterona sérica no final do estro e fase de diestro, que estimula a proliferação glandular, aumenta atividade secretória das glândulas endometriais, promove fechamento da cérvix, redução da atividade leucocitária, inibição da atividade contrátil do miométrio impedindo a drenagem de fluido intra-uterino, favorecem as modificações estruturais do útero e contribuem para o desenvolvimento da afecção (HARDY & OSBORNE, 1974; JOHNSTON et al., 2001; FIENI, 2006). As concentrações hormonais nas fêmeas acometidas por piometra são normais, a afecção é consequência da irregularidade nos receptores endometriais de estrógeno e progesterona (SCHOON et al., 1992; FALDYNA et al., 2001; STONE, 2003; ROOT KUSTRITZ, 2005).

O distúrbio ocorre mais comumente no diestro, fase lútea, caracterizada pela ocorrência de secreção ativa de progesterona, geralmente três a seis semanas após o final do estro, podendo, contudo, aparecer no final do estro (SLATTER, 2007; JOHNSON, 1995) ou início de anestro (NOAKES et al., 2001). Nos casos de piometra diagnosticadas na fase de anestro (aproximadamente um

terço dos casos), é incerto se os animais desenvolveram a afecção de forma mais lenta, ou se ocorreu redução prematura da fase lútea (NOAKES et al., 2001). O encurtamento prematuro da fase lútea pode ser induzido por produção endógena de prostaglandinas em resposta à inflamação uterina, como observado em outras espécies (NOAKES et al., 2001).

Acredita-se que alguns fatores possam predispor ao desenvolvimento da hiperplasia endometrial cística e piometra, como pseudogestação, irregularidade de ciclo estral, condição de nulípara, administração exógena de progestágenos (FIENI, 2006) e idade da fêmea canina (ALLEN, 1995).

Os sinais clínicos são bem descritos e derivam do sítio de infecção, como descarga vaginal mucopurulenta ou serosanguinolenta, em 75% dos casos e dor abdominal, e efeitos sistêmicos como prostração, anorexia, poliúria, polidipsia, êmese (JOHNSTON et al., 2001), desidratação e hipertermia, em 20% dos casos (VERSTEGEN et al., 2008). Endotoxinas, segmento de lipopolissacarídeo da membrana celular da bactéria gram-negativo, são liberadas para a circulação durante crescimento ou morte bacteriana; possuem várias propriedades biológicas e são responsáveis pelos sinais sistêmicos da piometra (GOODWIN & SCHAER, 1989), estando envolvida na patogênese da afecção, onde cães não sobreviventes ao tratamento apresentam níveis plasmáticos elevados no momento do diagnóstico (OKANO et al., 1998; HAGMAN et al., 2006). Em doses moderadas, resultam em leucocitose, hipertermia, êmese, prostração, hiporexia, hipotensão progressiva, choque e óbito (PANCIERA et al., 2003).

Muitas fêmeas caninas com piometra apresentam leucocitose, neutrofilia, monocitose, linfopenia (OHLSON, 2005), hipoalbuminemia, bilirubinemia, hipercolesterolemia, aumento nos níveis séricos de ALP e AST e azotemia renal e pré-renal (NOAKES, 2001; FRANSSON, 2003).

Até a presente data, a intervenção cirúrgica por meio de ovariohisterectomia é recomendada para pacientes em críticas condições clínicas, entretanto, pacientes em condições clínicas não muito graves, com alto valor zootécnico,

podem ser submetidos a tratamento clínico e monitoração intensiva, para assegurar cura completa e evitar recidivas (MEMON & MICKELSEN, 1993).

Atualmente, o estudo da etiopatogenia da piometra vem recebendo atenção especial por diferentes pesquisadores, face ao conhecimento limitado da patogenia, bem como pelo advento de novas técnicas de biologia molecular que têm possibilitado a melhor compreensão do complexo hiperplasia endometrial cística/piometra (DE BOSSCHERE et al., 2001; FELDMAN & NELSON, 2004; ARORA et al., 2006).

## 2.8 Imunoistoquímica

A imunoistoquímica (IHQ), segmento da histoquímica, é um conjunto de técnicas cuja crescente utilização tem provocado grande impacto na patologia humana e veterinária, devido a sua elevada sensibilidade e especificidade (OLIVEIRA, 1998). Teve origem na década de 40 com o desenvolvimento das técnicas de imunofluorescência (COONS, 1961; GIMENO, 1995). A IHQ, além de combinar técnicas anatômicas, imunológicas e bioquímicas, tem como principais vantagens a localização de componentes teciduais definidos (*in situ*) mediante o emprego de anticorpos específicos, moléculas marcadoras e a utilização de amostras conservadas por diferentes métodos, como fixação em formol e congelamento (GIMENO, 1995), possibilitando observação das alterações patológicas ocorridas nos tecidos humanos e animais, devido à ação defeituosa de moléculas, proteínas em sua grande maioria, as quais têm sido identificadas e correlacionadas com as características da doença em questão (PINHO, 2005).

Além de representarem uma importante ferramenta na área de pesquisas, a imunoistoquímica é utilizada de forma frequente na definição de diagnósticos e indicação de tratamentos na prática clínica (PINHO, 2005), por ser um método que permite a localização de substâncias, como proteínas séricas, imunoglobulinas, enzimas, hormônios e patógenos, em tecidos íntegros (GIMENO, 1995).

## 2.9 CYR61

A proteína CYR61 faz parte da família das CCN (família conectivo cisteína nefroblastoma), caracterizada por 50 a 90% de homologia na sequência de aminoácidos, entre *Cystein rich proteins 61* (CYR61 - CCN1), *Connective tissue growth factor* (CTGF - CCN2), *Nephroblastoma-overexpressed gene* (NOV - CCN3) e *Wnt-induced secreted proteins-1* (WISP1 - CCN4), -2 (WISP2 - CCN5) e -3 (WISP3 - CCN6) (PERBAL et al., 2003; BRIGSTOCK, 2003). A maioria dos membros da família CCN compartilha estrutura modular uniforme, exibindo diversas funções celulares fisiológicas e patológicas (BRIGSTOCK, 1999; PERBAL, 2004). Os produtos da transdução de membros da família CCN são proteínas secretadas de 343 a 381 resíduos aminoácidos, que compreendem quatro módulos estruturais distintos, cada um contendo 38 resíduos conservados de cisteínas (SAKAMOTO et al., 2004). As proteínas, membros da família CCN 1) apresentam elevado grau de conservação entre os membros da CCN e entre espécies, 2) são proteínas ricas em cisteínas e estruturalmente similares na associação das moléculas à matriz extracelular, 3) são compostas de domínios modulados multifuncionais, e 4) modulam funções diversas no comportamento celular; crescimento, diferenciação, adesão, migração e mitogênese (KIREEVA et al., 1996; BABIC et al., 1998; KOLESNIKOVA & LAU, 1998). Todos os membros da família CCN possuem peptídeo sinalizador secretório no terminal N, indicando que são proteínas secretórias (XIE et al., 2001a,b).

A proteína *CYR61* é um *immediate early gene* (IEG), reguladora de fatores de crescimento, expressa em vários tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliais (KIREEVA et al., 1996) e osteoblastos (SCHUTZE et al., 1998), em resposta a fatores de crescimento, citocinas (SAKAMOTO et al., 2004) e estrógeno (LAU & NATHANS, 1987; SCHUTZE et al., 1998; TSAI et al., 2002). O marcador CYR61 é codificado por um gene induzido por fatores de crescimento que se associam com matriz extracelular e superfície celular (O'BRIEN et al., 1990; MARTINERIE et al., 1997).

A CYR61 está bem caracterizada como função de ligante de integrina (BABIC et al., 1999; JEDSADAYANMATA et al., 1999) e seus efeitos são mediados através desta ligação, conhecida por modular migração celular e fatores de crescimento sinalizados em outros sistemas (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999). A proteína CYR61, através de mecanismos mediados pela heparina (BRIGSTOCK, 2003; PERBAL et al., 2003) e integrina, está envolvido na regulação de processos como proliferação celular, diferenciação celular, síntese de matriz extracelular (BRIGSTOCK, 1999; PERBAL, 2001), adesão celular, proteção contra apoptose, quimiotaxia, angiogênese (KIREEVA et al., 1996; BABIC et al., 1998; KOLESNIKOVA & LAU, 1998), condrogênese (BABIC et al., 1998), formação de tecido de cicatrização, fibrose e tumorigênese (BRIGSTOCK 2003). Promove quimiotaxia de fibroblastos aumentando o efeito mitogênico dos fatores de crescimento sobre estas células (KIREEVA et al., 1996). O gene CYR61 codifica uma proteína rica em cisteína secretada por ligante da heparina (KIREEVA et al., 1996) e se acumula após ser secretada na matriz extracelular, onde permanece estável (YANG & LAU, 1991; KIREEVA et al., 1997), e associada à superfície é rapidamente degradada por um mecanismo desconhecido (YANG & LAU, 1991).

Apresenta-se em níveis baixos nas células em repouso, como fibroblastos quiescentes, mas são rapidamente induzidas em resposta ao fator de crescimento epidermal (EGF) (SIMMONS et al., 1989; O'BRIEN et al., 1990), fator básico de crescimento dos fibroblastos (bFGF), divisão celular (O'BRIEN et al., 1990), em resposta ao estrógeno no tecido uterino (RIVERA-GONZALEZ et al., 1998), vitamina D3, nos osteoblastos fetais (SCHUTZE et al., 1998), fator  $\alpha$  de necrose tumoral e pelo fator VII-a, interleucina-1 e trombina nos fibroblastos humanos (O'BRIEN et al., 1990; PENDURTHI et al., 2000).

Este marcador tem alta expressão no desenvolvimento de vasos sanguíneos, migração de células endoteliais, cicatrização de feridas e diferenciação progressiva de tumores e condrócitos (O'BRIEN & LAU, 1992; BABIC et al., 1998). No desenvolvimento embrionário, a expressão da CYR61 é

elevada em locais de neovascularização e condensação mesenquimal (O'BRIEN & LAU, 1992) o que confirma seu papel na regulação de processos como angiogênese, condrogênese (KIRIEVA et al., 1996; BABIC et al., 1998; BABIC et al., 1999) e tumorigênese (XIE et al., 2001a,b; SAMPATH et al., 2001a,b; MENENDEZ et al., 2003). A proteína também foi observada em todas as partes do encéfalo de humanos adultos (NAUS et al., 2000), durante a diferenciação neuronal das linhagens de células do hipocampo (CHUNG & AHN, 1998) e em resposta a estimulação dos receptores muscarínicos de acetilcolina nas células HEK293 (NAUS et al., 2000).

Apesar da CYR61 estar mais envolvida com desenvolvimento e diferenciação embrionária, se encontra presente em processos patológicos (BRIGSTOCK, 1999). Pesquisas recentes indicam que a expressão aberrante da CYR61 está associada com diversas afecções, incluindo arteriosclerose (HILFIKER et al., 2002; SCHOBBER et al., 2002), reestenose vascular (WU et al., 2002), trombose (PENDURTHI et al., 2000), neoplasia pancreática e glioma (TSAI et al., 2002; XIE et al., 2004; HOLLOWAY et al., 2005). XIE et al. (2004) demonstrou que glioblastomas possuem alta expressão de CYR61, e os tumores com alta expressão possuem pior prognóstico que os mesmos tumores com baixa expressão. Paradoxalmente, a proteína CYR61 age como supressor tumoral em neoplasias de pulmão (TONG et al., 2001; TONG et al., 2004), devido a regulação positiva de p53, p21 e decréscimo na atividade da cinase ciclina-dependentes (TONG et al., 2001; TONG et al., 2004).

Foi identificada alta expressão em neoplasias mamárias (SAMPATH et al., 2001a,b; XIE et al., 2001a,b; MENENDEZ et al., 2003), como adenocarcinomas mamários (TSAI et al., 2002; XIE et al., 2004; HOLLOWAY et al., 2005) e expressão alta de CYR61 está associada com neoplasias mamárias em estágios mais avançados (XIE et al., 2001a,b; TSAI et al., 2002) e tipos tumorais que metastizam para os ossos (SAMPATH et al., 2001a,b; XIE et al., 2001a,b; PENDURTHI et al., 2000; WU et al., 2000; HILFIKER et al., 2002; SCHOBBER et al., 2002; MENENDEZ et al., 2003).



No trato reprodutor foi relatado importante expressão da proteína no desenvolvimento de alterações prostáticas, principalmente em hiperplasia prostática benigna (HPB) em humanos e cães (SAKAMOTO et al., 2003; SAKAMOTO et al., 2004b; OLIVEIRA et al., 2006), neoplasias prostáticas em cães (OLIVEIRA et al., 2006) e em enfermidades uterinas e ovarianas em mulheres (MACLAUGHLAN et al., 2007), como afecções do endométrio, com marcação positiva também em fêmeas de babuíno (*Papio anubis*) (GASHAW et al., 2006).

GELLHAUS et al. (2006) demonstrou que a proteína CYR61 se encontra em níveis elevados na placenta de mulheres gestantes, mas em níveis baixos em mulheres acometidas por pré-eclampsia.

CHIEN et al. (2004) verificou níveis baixos de CYR61 em neoplasias endometriais, como o adenocarcinoma, e demonstrou que esta proteína suprime o crescimento de células cancerígenas por promover apoptose das células de carcinoma do endométrio. SAMPATH et al. (2001a,b) demonstrou expressão reduzida da CYR61 em leiomiomas uterinos comparados a miométrios normais em mulheres. CHIEN et al. (2004) demonstrou redução na expressão do CYR61 em neoplasias endometriais, quando comparados á endométrios normais de mulheres e ratas, pois a expressão forçada de CYR61 nas células cancerígenas indiferenciadas inibiu o crescimento celular, redução na formação tumoral e promoveu apoptose de células cancerígenas endometriais.

PILARSKY et al. (1998) encontraram expressão reduzida do CYR61 em neoplasias prostáticas em homens, demonstrando que a baixa expressão da proteína pode promover crescimento tumoral e invasão da neoplasia epitelial para os componentes estromais do órgão.

A endometriose é uma importante condição ginecológica estrógeno dependente que afeta mulheres em idade reprodutiva, caracterizando fragmentos de tecido endometrial em locais diferentes do lúmen uterino (GIUDICE & KAO, 2004). As lesões de endometriose alteram o funcionamento do endométrio normal mantendo um estágio estrogênico no tecido, prejudicando o estabelecimento de uma prenhez. A expressão da CYR61 é maior no endométrio eutópico e ectópico

de mulheres afetadas pela endometriose, quando comparadas às mulheres normais (ABSENGER et al., 2004). A regulação da CYR61 pelo estrógeno foi descrita nos endométrios ectópicos, mas o tratamento com GnRH1 agonista em mulheres acometidas por esta afecção não resultou em alterações na expressão desta proteína nos endométrios ectópicos, sugerindo a existência de outros fatores que regulam sua expressão além dos hormônios ovarianos (ABSENGER et al., 2004). A identificação da expressão elevada do gene ou proteína CYR61 sugere a predisposição das mulheres a desenvolverem endometriose. GASHAW et al. (2006) utilizou fêmeas de babuíno (*Papio anubis*) como modelo experimental devido a grande semelhança com o ciclo menstrual das mulheres, evidenciando em seu estudo que os níveis de CYR61 se encontram elevados nos endométrios eutópicos e ectópicos dos animais induzidos experimentalmente a endometriose.

A expressão aberrante de CYR61 é associada com parâmetros clínicos e patológicos (XIE et al., 2001a,b), regulados por  $17\beta$ -estradiol (SAMPATH et al., 2001), como demonstrado em ratos (RIVERA-GONZALEZ et al., 1998) e mulheres (SAMPATH et al., 2001; XIE et al., 2001a,b). O  $17\beta$ -estradiol aumenta a expressão do CYR61 em células normais ou neoplásicas de glândula mamária. O CYR61 desenvolve papel importante na progressão tumoral, visto que a alta expressão em células normais da glândula mamária, resultaram em formação tumoral em camundongos, segundo XIE et al. (2001b). Tumores de mama que expressaram o CYR61 apresentaram maior expressão de receptores de estrógeno (ER), do que os tumores com baixa expressão ou que não expressaram CYR61. XIE et al. (2001b) afirma que o estrógeno atua através de um ou mais genes primários responsivos ao estrógeno, cujos produtos regulam a expressão do CYR61.

PLANQUE & PERBAL (2003) e BRIGSTOCK (2003) afirmam que a CYR61 desempenha funções diferentes de acordo com o tecido de origem, assim como outros membros da família de proteínas CCN. As propriedades biológicas dessas proteínas dependem da interação molecular aplicada, para resultar em efeitos negativos ou positivos ao tecido.

Várias funções mediadas pela CYR61, como crescimento tumoral, angiogênese e neovascularização, são especificamente inibidas pelo anticorpo anti-CYR61 e/ou anticorpos anti-integrina (BABIC et al., 1998; TSAI et al., 2000; SAMPATH et al., 2001). Portanto, a inibição da ligação da CYR61 ao seu receptor, interferindo em uma ou mais vias intracelulares mediadas por CYR61, e/ou a supressão da produção de CYR61 pelas células, são consideradas alvos de vários projetos de pesquisa (SAKAMOTO et al., 2003).

### **III. OBJETIVO**

Objetivou-se com este trabalho determinar a marcação da proteína CYR61, por meio de IHQ, nos órgãos reprodutores de fêmeas caninas pré-púberes, fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra; identificar e avaliar a ação da CYR61 atuando como potente regulador na iniciação e progressão da hiperplasia endometrial cística e piometra e determinar a influência e correlação de diferentes níveis séricos de  $17\beta$ -estradiol e progesterona sob a expressão da proteína CYR61 nos órgãos reprodutores.

### **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi conduzido com a devida aprovação da Comissão de Ética e Bem Estar Animal no uso de Animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal (FCAV/UNESP), protocolo número 007834-09, no Setor de Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, em parceria com o Laboratório de Imunoistoquímica Veterinária do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (FCAV/UNESP), Laboratório de Histologia e Embriologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (FCAV/UNESP), Associação Protetora dos Animais

de Jaboticabal (APA) e Serviço de Patologia Veterinária, do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Câmpus de Botucatu (FMVZ/UNESP).

#### **4.1 Seleção dos animais**

As amostras do trato reprodutor das fêmeas caninas pré-púberes e nas diferentes fases do ciclo estral foram obtidas durante ovariectomias (OH) eletivas no Serviço de Obstetrícia e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) – Câmpus de Jaboticabal, e no Projeto de Esterilização Animal da Associação Protetora dos Animais (APA) de Jaboticabal.

As fêmeas caninas selecionadas para este estudo, para comporem os grupos das fêmeas normais nas diferentes fases do ciclo estral, eram animais hígdos, sem qualquer alteração ou afecção no trato reprodutor ou em outros sistemas. Sessenta e uma fêmeas (n=61) com idade compreendida entre dois e cinco anos, pesando entre 5 e 35kg, foram separadas em grupos, de acordo com a fase do ciclo estral que se encontravam, 13 fêmeas em fase de proestro, 16 fêmeas em estro, 16 fêmeas em diestro e 16 fêmeas em anestro. Quinze fêmeas caninas (n=15) eram animais pré-púberes, com até cinco meses de idade, sem restrição de peso. Os animais eram submetidos a exames clínicos e laboratoriais para confirmação da hígidez, e submetidos ao protocolo anestésico adequado para cada caso. As 61 fêmeas caninas selecionadas para comporem os grupos das diferentes fases do ciclo estral foram selecionadas entre 200 fêmeas caninas, submetidas a histórico reprodutivo detalhado, exame de macroscopia vulvar, citologia vaginal, dosagem de progesterona e estradiol. Foram selecionadas as fêmeas que apresentavam citologia vaginal, dosagem sérica de progesterona e estradiol características com a fase do ciclo estral à qual se encontravam; portanto, foram selecionadas fêmeas na fase intermediária do proestro, intermediária do estro, nas três primeiras semanas da fase de diestro e fase

intermediária do anestro. Devido ao grande número de fatores que influenciam no resultado das dosagens séricas hormonais de progesterona e estradiol, foram padronizados os horários da coleta de sangue, entre oito e dez horas da manhã, em dias com temperatura ambiente entre 27 e 32°C.

Foram utilizadas vinte e quatro fêmeas caninas acometidas por piometra (n=24), atendidas no Setor de Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) – Câmpus de Jaboticabal. A afecção era diagnosticada por meio do histórico do animal, sinais clínicos, exame físico, exames laboratoriais e exames de imagem (radiografia e ultrassonografia abdominal). Os animais eram estabilizados e submetidos à ovariectomia terapêutica de emergência.

#### **4.2 Identificação da fase do ciclo estral**

As fases do ciclo estral foram identificadas por meio do histórico do animal, macroscopia vulvar, dosagem de progesterona e por citologia vaginal, confeccionando-se quatro esfregaços, dois corados por coloração de Panótico Rápido (Triarilmetano 0,1%, Xantenos 0,1% e Tiazinas 0,1%, 620100, Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), e dois por coloração de Papanicolaou (Tincion Rápida – Hemacolor®, nº 1116610001, Merck, KGaA, Darmstadt, Alemanha), onde as células eram analisadas quantitativamente e qualitativamente, conforme Figura 1.

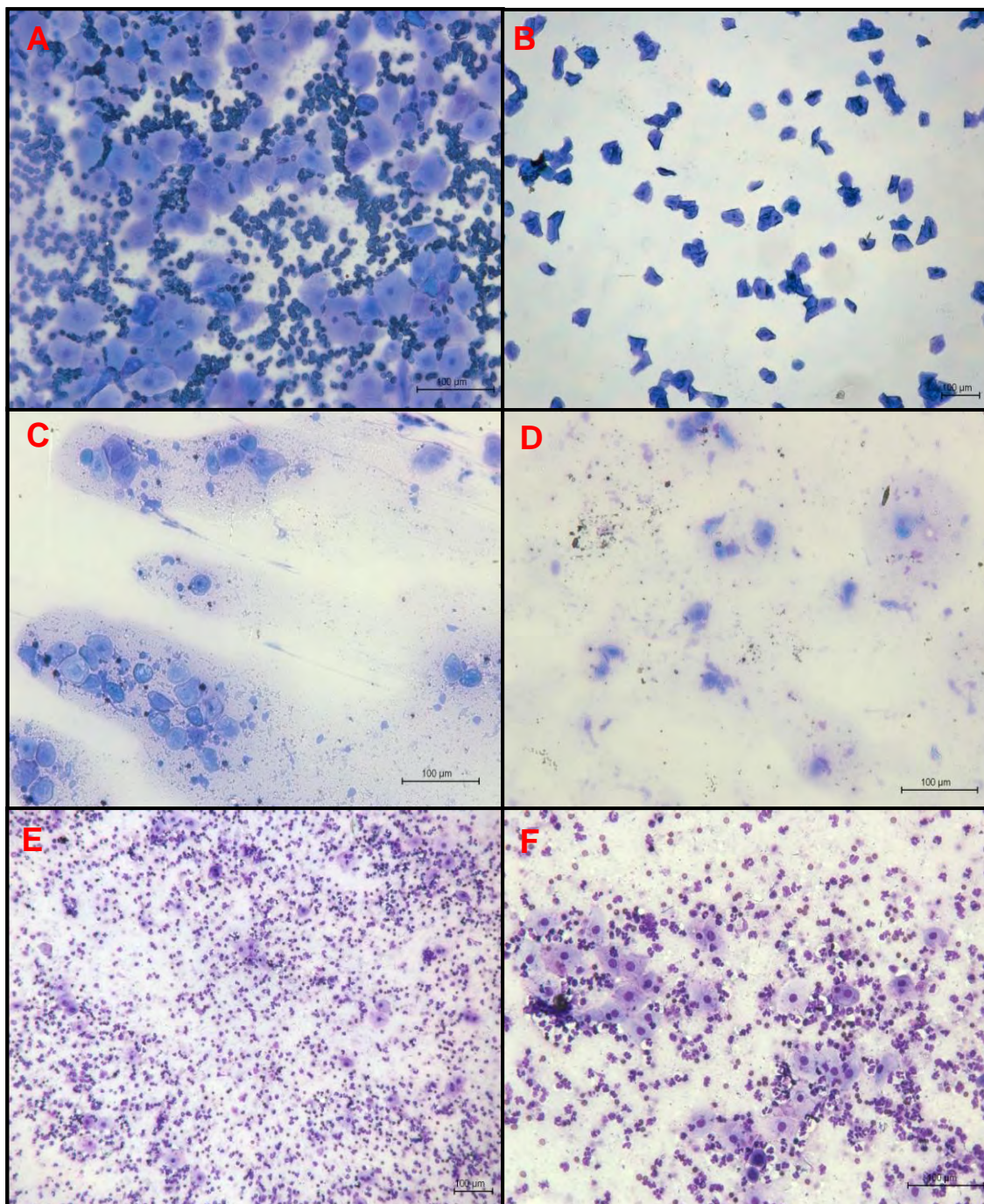


Figura 1. Citologia vaginal de fêmea canina, Panótico Rápido, 10x e 40x. (A) **Próestro**: eritrócitos, células intermediárias e superficiais nucleadas e anucleadas, 40x. (B) **Estro**: células superficiais nucleadas e anucleadas, 10x, (C) **Diestro**: células parabasais, células intermediárias, células superficiais, 10x, (D) **Anestro**: células parabasais e células intermediárias, 10x (E e F) **Piometra**: células parabasais, células intermediárias, células superficiais, neutrófilos, bactérias e eritrócitos, 10x e 40x respectivamente.

### 4.3 Coleta do material

Foram coletadas amostras dos ovários, tuba uterina, cornos uterinos e corpo do útero, de todas as fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral e das 15 fêmeas pré-púberes, totalizando 76 fêmeas caninas saudáveis (n=76) e amostras de 24 fêmeas caninas acometidas por piometra (n=24), totalizando 100 fêmeas caninas utilizadas (n=100). Foram utilizadas uma amostra de cada tecido (ovário, corno uterino, corpo do útero e tuba uterina), quatro amostras por animal, totalizando 400 amostras (n=400).

Após ovariectomia pela técnica usual, como demonstrada na Figura 2, fragmentos de 0,5x1,5cm de tecido dos ovários, tuba uterina, corno uterino e corpo de útero, foram fixados em solução de formaldeído 10% tamponada com fosfatos (pH 7.4) e armazenados em potes coletores por 24 horas. Após fixação, as amostras foram submetidas a cortes longitudinais de aproximadamente 3mm de espessura de cada tecido. Os cortes foram armazenados em cassetes previamente identificados e mantidos em álcool 70% por 24 horas até o processamento histológico.

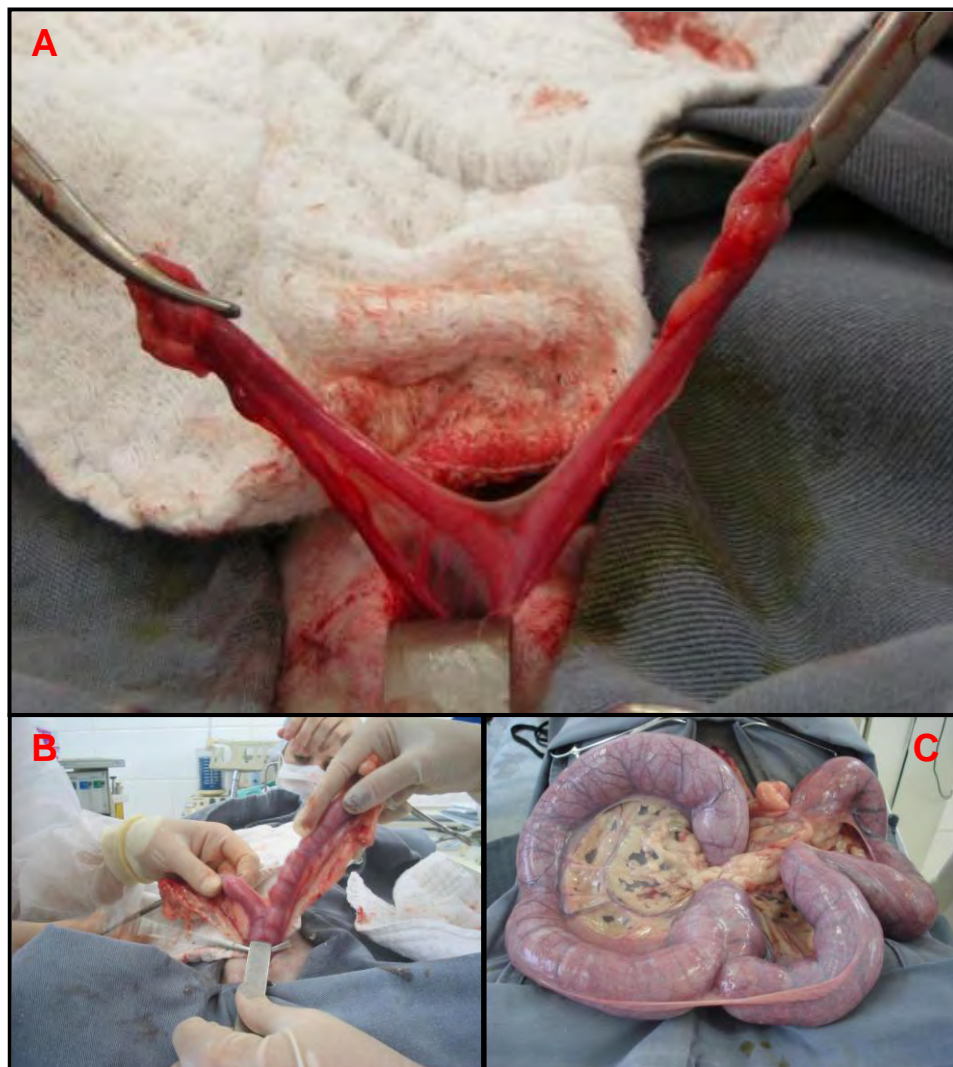


Figura 2. Cirurgia de ovariectomia, realizada no Setor de Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal, do Hospital Veterinário da FCAV – UNESP. Arquivo pessoal. (A) OH eletiva, anestro. (B) OH terapêutica para piometra e, (C) terapêutica para piometra.

#### 4.4 Dosagem de progesterona e estradiol

Foram coletados de 5 a 10mL de sangue de cada fêmea canina, antes do procedimento anestésico. O sangue era armazenado temporariamente em tubo de ensaio de vidro e centrifugado por 20 minutos em velocidade de rotação de 1400g, 2mL de soro foram armazenados em eppendorf e enviados sob refrigeração, para



dosagem de progesterona e estradiol pelo método de quimioluminescência no Laboratório Álvaro – Centro de Análises e Pesquisas Clínicas, localizado na cidade de Cascavel – PR.

#### **4.5 Processamento do material**

A preparação das lâminas histológicas foi desenvolvida no laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da FCAV – UNESP, através da técnica de rotina histológica descrita por TOLOSA et al. (2003), que compreende a desidratação dos tecidos, diafanização, infiltração e inclusão em Histosec®, para confecção dos blocos. Os blocos foram seccionados no micrótomo para obtenção de cortes de 4µm de espessura, dispostos em lâminas de vidro previamente preparadas com Poli-L-Lisina (P8920, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), para as lâminas submetidas à técnica de imunohistoquímica.

#### **4.6 Coloração em Hematoxilina de Harris e Eosina de Lyson (HE)**

Para coloração em Hematoxilina de Harris e Eosina de Lyson, as 400 lâminas foram previamente desparafinizadas, hidratadas e coradas com Hematoxilina Monohidratada (59380025, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany), e Eosina de Lyson (59350025, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). As lâminas coradas foram desidratadas, diafanizadas e montadas em lamínula.

#### **4.7 Imunoistoquímica**

A técnica de IHQ foi fundamentada no sistema polímero-peroxidase (Dako Envision System) e desenvolvida no Laboratório de Imunoistoquímica, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV – UNESP.

As 400 lâminas foram mantidas em estufa a 60°C por duas horas, com subsequente desparafinização dos cortes com banhos de xilol PA duas vezes – 30 minutos cada, soluções decrescentes de álcool (absoluto PA 99,5% três vezes – 10 minutos cada, 95% - 10 minutos, 80% - 10 minutos e 70% - 10 minutos), seguidos de lavagem em água destilada. A peroxidase endógena foi neutralizada utilizando solução de 5% de peróxido de hidrogênio PA 30% (P2233.01.BJ, Labsynth, Diadema, SP, Brasil), diluído em álcool metílico PA (A1085.01.BJ, Labsynth, Diadema, SP, Brasil), duas vezes, por 10 minutos. Após três lavagens de 5 minutos em solução PBS (pH 7.4), foi realizada a recuperação antigênica por meio de solução tampão de citrato de sódio (pH 6.0) em panela de pressão por 3 minutos após atingir temperatura de 120°C. As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos e lavadas três vezes de cinco minutos em solução PBS (pH 7.4). As proteínas inespecíficas foram bloqueadas com Protein Block (X0909, Dako, Carpinteria, CA, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente em sistema úmido e fechado.

O anticorpo anti-CYR61 foi diluído em 1:300, em Antibody Diluent with Background Reducing Components (S3020, Dako, Carpinteria, CA, USA) e adicionado aos cortes para incubação em sistema úmido e fechado, por toda noite, a temperatura de 4°C. Após permanência em temperatura ambiente por 30 minutos, as lâminas foram lavadas com solução de PBS (pH 7.4) três vezes por cinco minutos para subsequente adição do anticorpo secundário Envision+Dual Link System-HRP (K4061, Dako, Carpinteria, CA, USA), mantido sob os tecidos por um período de uma hora a temperatura ambiente em sistema úmido e fechado. Após três lavagens de cinco minutos com solução de PBS (pH 7.4), a reação foi detectada pela adição de 3,3 “dihydrate diaminobenzidine-tetrahydrochloride” (DAB, Dako, Carpinteria, CA, USA) aos cortes por dois minutos e a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris.

O controle negativo foi realizado com os cortes de ovário, tuba uterina, corno uterino e corpo do útero, com a substituição do anticorpo anti-CYR61 por

imunoglobulina de coelho disponível no Universal Negative Control Rabbit (N1699, Dako, Carpinteria, CA, USA), nas mesmas condições do anticorpo primário.

As lâminas foram montadas com Entellan (107960, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) e lamínulas.

#### **4.8 Análise morfológica**

As lâminas coradas em HE foram analisadas no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, em microscópio Nikon Eclipse E200 trinocular, com câmera digital Moticam 2300, 3.0MP. Foram realizadas análise qualitativa e descritiva dos componentes estruturais dos órgãos reprodutores nas diferentes fases do ciclo estral, pré-puberdade e piometra.

As lâminas de IHQ foram analisadas no Laboratório de Morfometria do Serviço de Patologia Veterinária, do Departamento de Clínica Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP, Câmpus de Botucatu, em microscópio LEICA Qwin Plus DMR - DFC500.

#### **4.9 Análises imunoistoquímica**

##### **4.9.1 Análise subjetiva de intensidade e distribuição marcação positiva**

Foram realizadas análise subjetiva de intensidade e distribuição de marcação, por dois observadores diferentes em microscópio Nikon Eclipse E200 trinocular; e análise morfométrica de área e porcentagem de área com marcação positiva para o anticorpo anti-CYR61, realizada no programa Leica QWin Plus V3.5.0, em microscópio LEICA Qwin Plus DMR - DFC500.

A análise subjetiva de intensidade de marcação foi realizada através da atribuição de números de um a três, correspondendo à marcação fraca, moderada e forte, respectivamente, em cada componente estrutural dos órgãos reprodutores,

como demonstrado nas Figuras 3, 4 e 5. A análise subjetiva de distribuição da marcação foi realizada através da atribuição de números de um a cinco, correspondendo à marcação de 1 a 5% das células do componente analisado, 6 a 25%, 26 a 50%, 51 a 75% e 76 a 100% respectivamente. Os componentes estruturais de cada órgão feminino foram observados em objetiva de 40x para conferir a localização da marcação positiva na célula.

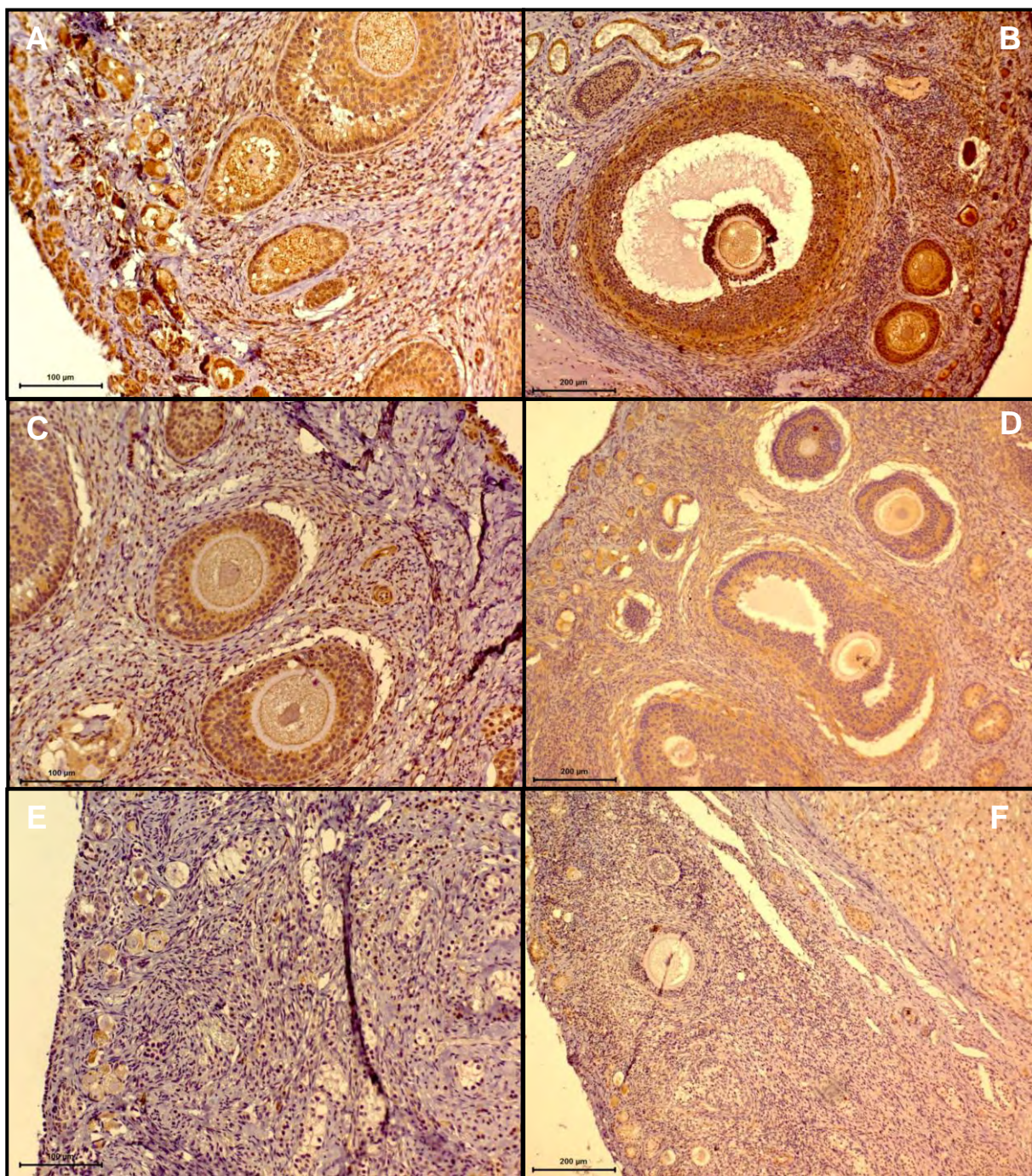


Figura 3. Expressão do CYR61 nos ovários das fêmeas caninas, 10x e 20x. (A e B) **Marcação forte**: folículos ovarianos, fibroblastos, glândulas intersticiais e epitélio cúbico simples, 20x e 10x respectivamente, (C e D) **Marcação moderada**: folículos ovarianos, fibroblastos da região cortical, glândulas intersticiais e epitélio cúbico simples, 20x e 10x respectivamente, (E e F) **Marcação fraca**: folículos ovarianos, corpo lúteo, fibroblastos da região cortical e epitélio cúbico simples, 20x e 10x, respectivamente.

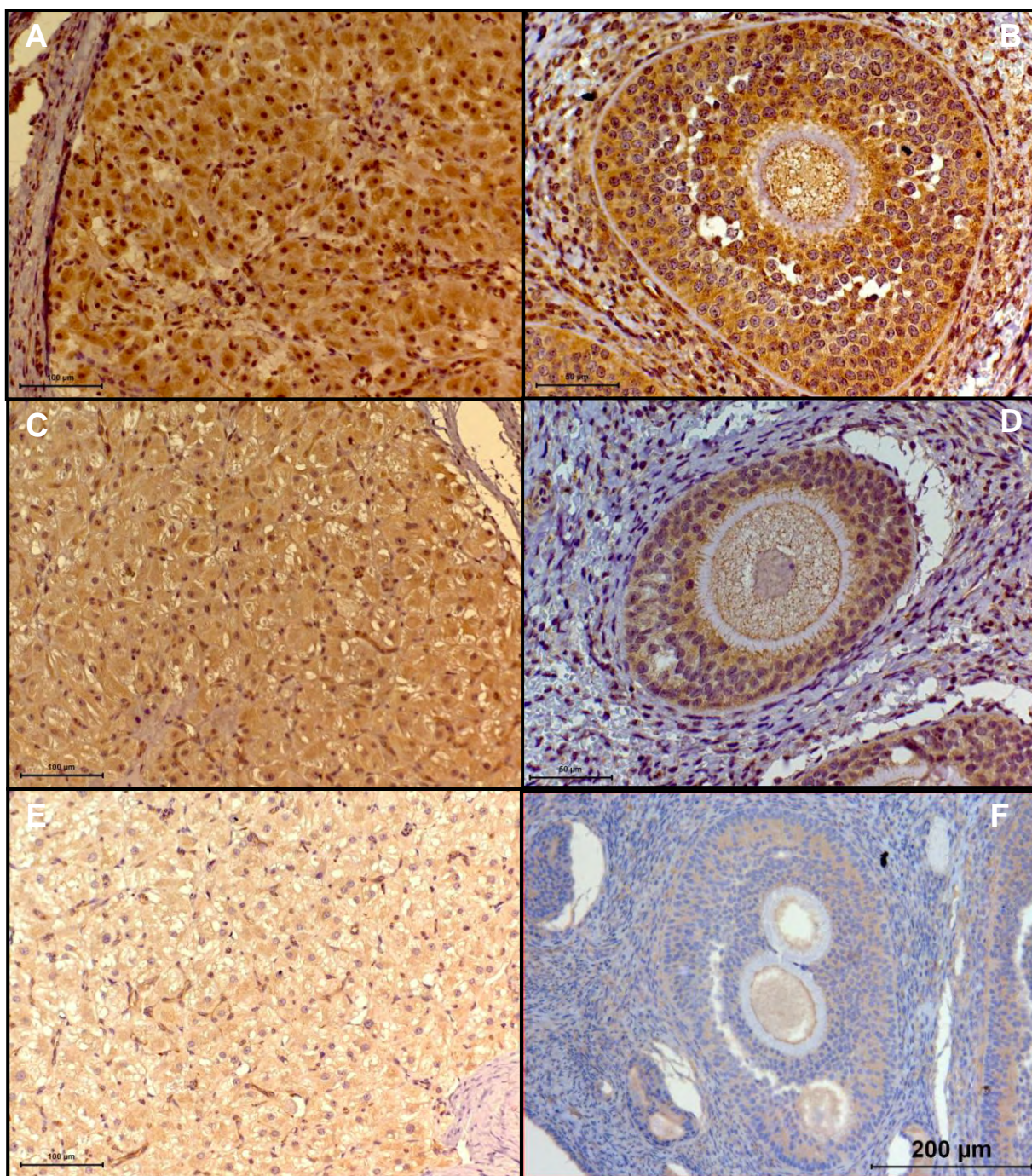


Figura 4. Expressão do CYR61 nos ovários das fêmeas caninas, 10x, 20x e 40x. (A) **Marcação forte**: corpo lúteo, 20x, (B) **Marcação forte**: folículo ovariano primário multilaminar, 40x, (C) **Marcação moderada**: corpo lúteo, 20x, (D) **Marcação moderada**: folículo ovariano primário multilaminar, 40x, (E) **Marcação fraca**: corpo lúteo, 20x, e (F) **Marcação fraca**: folículo ovariano primário multilaminar, 10x.

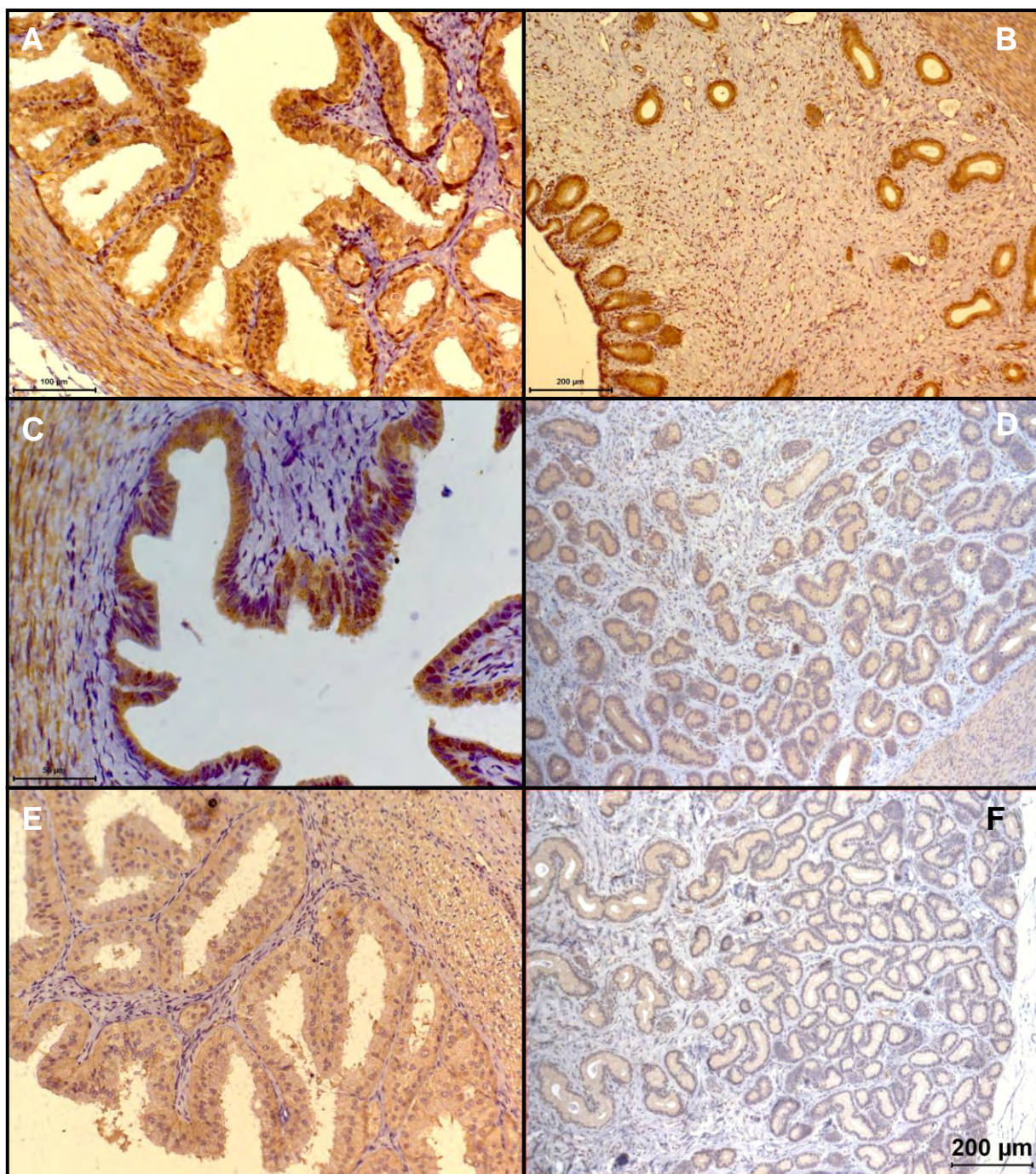


Figura 5. Expressão do *CYR61* no corno uterino e corpo do útero (10x), e tuba uterina (20x) das fêmeas caninas. (A) **Marcação forte**: epitélio cúbico simples e fibras musculares lisas da tuba uterina, (B) **Marcação forte**: glândulas endometriais, epitélio de revestimento, fibras musculares lisas e fibroblastos, (C) **Marcação moderada**: epitélio cúbico simples e fibras musculares lisas da tuba uterina, (D) **Marcação moderada**: glândulas endometriais, epitélio de revestimento, fibras musculares lisas e fibroblastos, (E) **Marcação fraca**: epitélio cúbico simples e fibras musculares lisas da tuba uterina e (F) **Marcação fraca**: glândulas endometriais, epitélio de revestimento, fibras musculares lisas e fibroblastos.

Os componentes estruturais de cada órgão feminino foram subdivididos para avaliação da intensidade e distribuição da marcação positiva conforme o Quadro 1.

Quadro 1. Relação das estruturas e componentes avaliados na análise de intensidade e distribuição de marcação positiva, em cada tecido.

Ovário	Corno Uterino	Corpo do Útero	Tuba Uterina
Epitélio Germinativo (ECS)	Perimétrio (TC)	Perimétrio (TC)	Serosa (TC e ECS)
Túnica Albugínea (TC)	Miométrio Longitudinal (FML)	Miométrio Longitudinal (FML)	Miométrio Longitudinal (FML)
Estroma (FB)	Estrato Vascular (FB)	Estrato Vascular (FB)	Mesométrio (TC, FB)
Folículos (CF)	Vasos Sanguíneos (MLA)	Vasos Sanguíneos (MLA)	Vasos sanguíneos (MLA)
Corpo Lúteo (CLT e CLG)	Miométrio Circular (FML)	Miométrio Circular (FML)	Miométrio Circular (FML)
Glândulas Intersticiais (CCS)	Lâmina Própria (TC e FB)	Lâmina Própria (TC e FB)	Lâmina Própria (TC e FB)
Vasos Sanguíneos (MLA)	Glândulas endometriais (CCS)	Glândulas endometriais (CCS)	Epitélio de revestimento (ECS)
	Epitélio de revestimento (CCS)	Epitélio de revestimento (CCS)	

As análises referentes à intensidade e distribuição de marcação positiva, por meio das variáveis ML (miométrio longitudinal), MC (miométrio circular), EV (estrato vascular), LP (lâmina própria), GE (glândulas endometriais) e ER (epitélio de revestimento), referentes ao corno uterino e corpo do útero, EG (epitélio germinativo), E (estroma), F (folículos), CL (corpo lúteo) e GI (glândulas intersticiais), referentes ao ovário e variáveis S (serosa), ML (miométrio longitudinal), MC (miométrio circular), LP (lâmina própria) e ER (epitélio de revestimento), referentes à tuba uterina, foram analisadas pelo teste de qui-quadrado, com nível de significância a 5%.



#### 4.9.2 Análise de área a porcentagem de área com marcação positiva

Para realização das análises de área e porcentagem de área com marcação positiva nas 100 lâminas de tuba uterina, das fêmeas caninas nas diferentes fases do ciclo estral e fêmeas caninas acometidas por piometra, foram capturadas, através de câmera digital em microscópio LEICA Qwin Plus DMR - DFC500, cinco fotos, englobando miométrio e endométrio, de cada lâmina de tuba uterina em aumento de 20x, obtendo *measure frame* de 265041,03  $\mu\text{m}^2$ . As medidas foram efetuadas em cada foto, por meio do programa Leica QWin Plus V3.5.0, como demonstrado na Figura 6.

Para as análises das 100 lâminas de ovário, foram capturadas cinco fotos da região do córtex ovariano em aumento de 10x, obtendo *measure frame* de 1060164.13  $\mu\text{m}^2$ , como demonstrado na Figura 7.

Para as análises das 100 lâminas de corno uterino e 100 lâminas de corpo do útero, foram capturadas cinco fotos da região do miométrio e mais cinco fotos da região do endométrio uterino, totalizando 10 fotos de cada lâmina de corno uterino e 10 fotos de cada lâmina de corpo do útero, em aumento de 10x nas fêmeas das fases de proestro, estro, diestro, anestro e fêmeas acometidas por piometra (*measure frame* de 1060164.13  $\mu\text{m}^2$ ), e em aumento de 20x em fêmeas pré-púberes (*measure frame* de 265041,03  $\mu\text{m}^2$ ).

Após captura das fotos por meio do programa Leica QWin Plus V.3.5.0, as imagens foram analisadas neste mesmo programa automático em processamento binário aRGB. Em cada imagem, alguns núcleos de células com marcação positiva eram selecionados e o programa identificava automaticamente todos os núcleos com um intervalo pré-determinado da intensidade de coloração em tons de vermelho e marrom (DAB) selecionada, obtendo medidas de área e porcentagem de área marcada. Após obtenção das medidas de núcleo, eram selecionados citoplasmas de algumas células com marcação positiva, e o programa identificava automaticamente todos os citoplasmas com um intervalo pré-determinado da intensidade de coloração em tons de vermelho e marrom

(DAB) selecionada, resultando em medidas de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva na imagem, como demonstrado nas Figuras 8, 9 e 10..

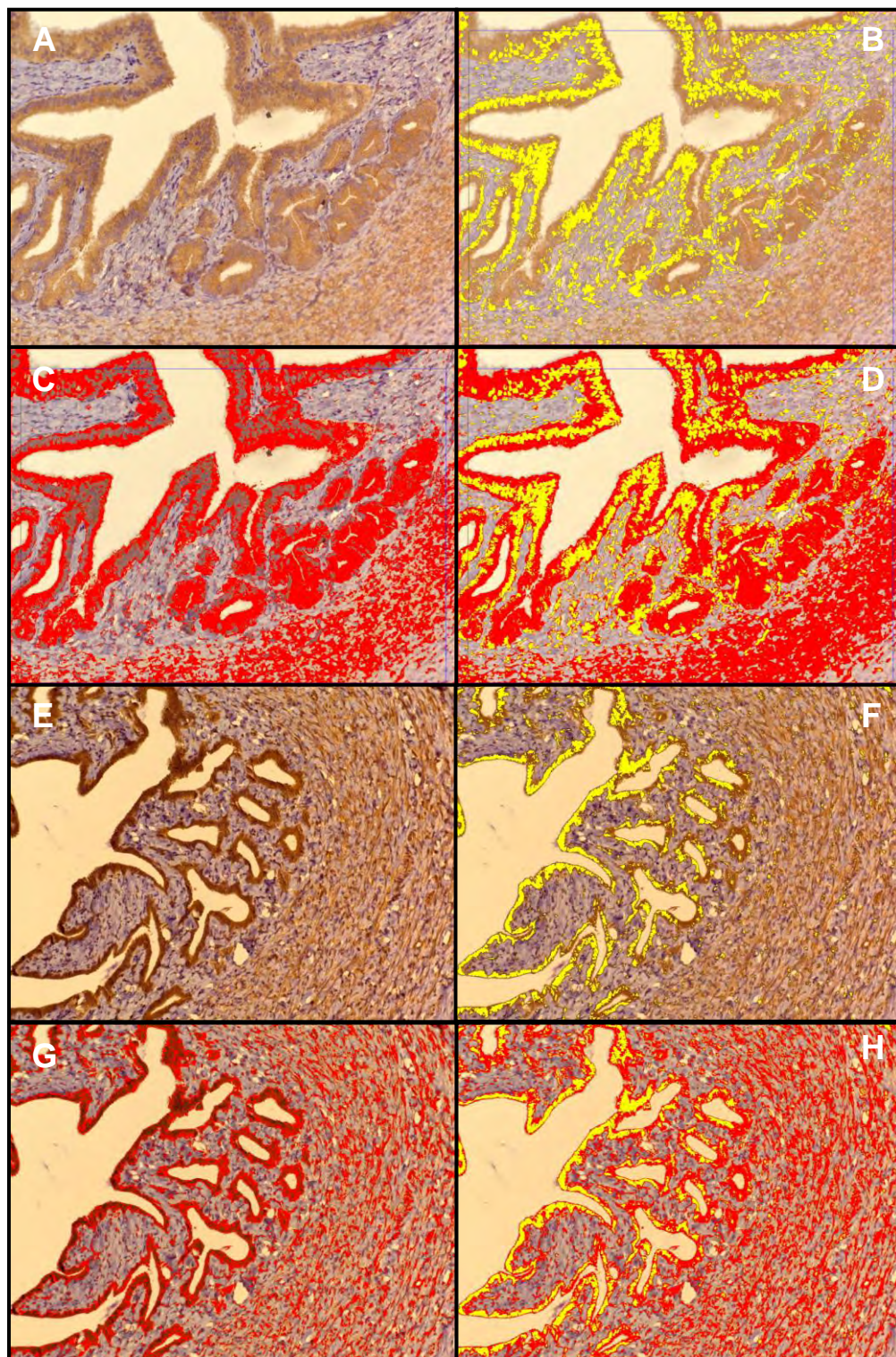


Figura 6. Análise morfológica de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva do CYR61, na região do endométrio e miométrio da **tuba uterina**, das fêmeas caninas, 20x. (A e E) expressão da proteína no epitélio de revestimento, fibroblastos e fibras musculares lisas, (B e F) seleção do núcleo das células que expressaram a proteína, (C e G) seleção do citoplasma das células com marcação positiva, (D e H) identificação da área nuclear e citoplasmática das células com expressão do CYR61.

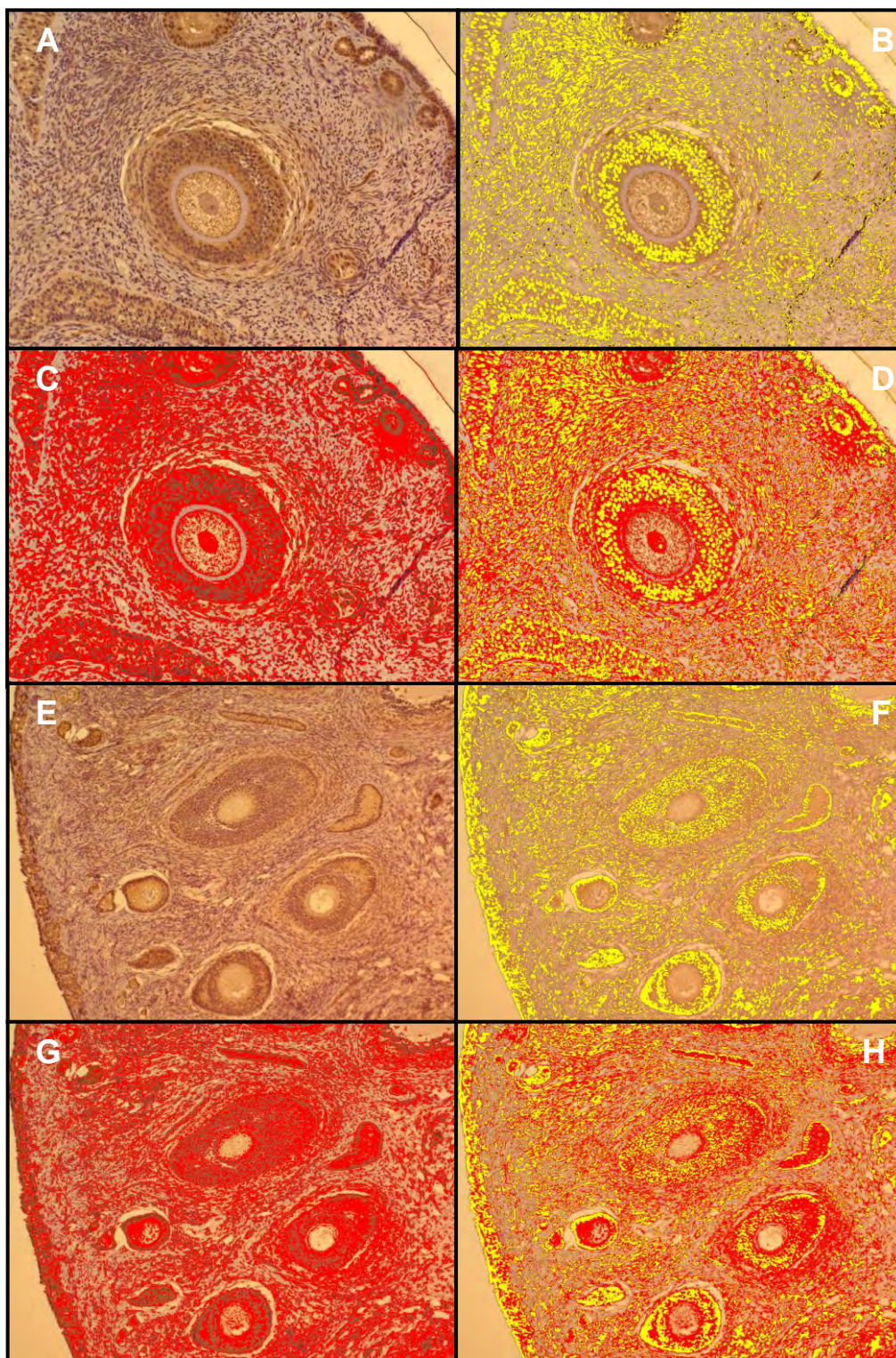


Figura 7. Análise morfométrica de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva na região cortical do **ovário**, das fêmeas caninas, 10x. (A e E) expressão da proteína nos componentes estruturais da região cortical dos ovários, (B e F) seleção do núcleo das células que expressaram a proteína, (C e G) seleção do citoplasma das células com marcação positiva, (D e H) identificação da área nuclear e citoplasmática das células com expressão do CYR61.

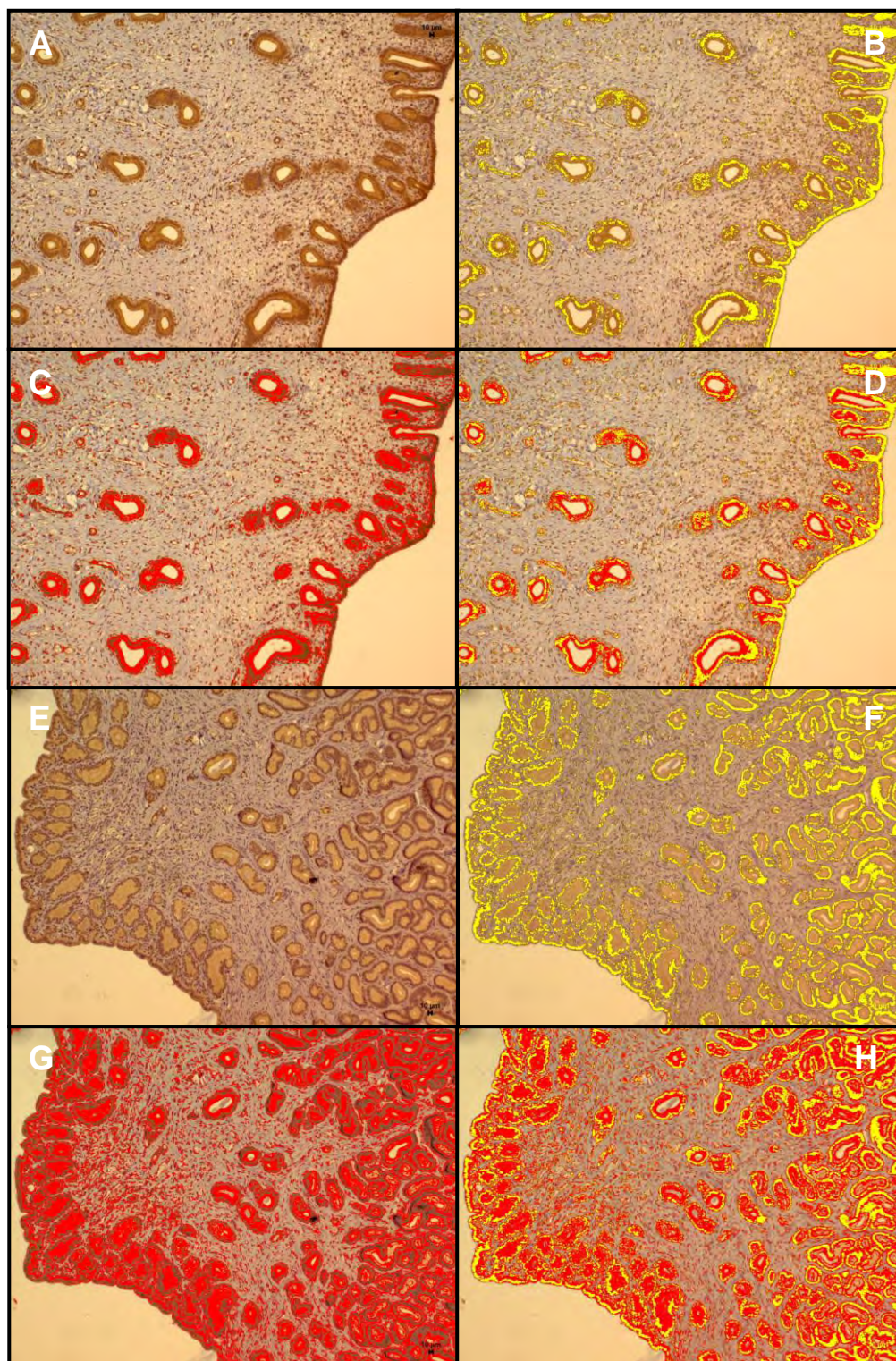


Figura 8. Análise morfométrica de área e porcentagem de área de marcação citoplasmática positiva, na região do endométrio do **cornu uterino e corpo do útero**, das fêmeas caninas, 10x. (A e E) expressão da proteína no epitélio de revestimento, glândulas endometriais e fibroblastos, (B e F) seleção do núcleo das células que expressaram a proteína, (C e G) seleção do citoplasma das células com marcação positiva, (D e H) identificação da área nuclear e citoplasmática das células com expressão do CYR61.

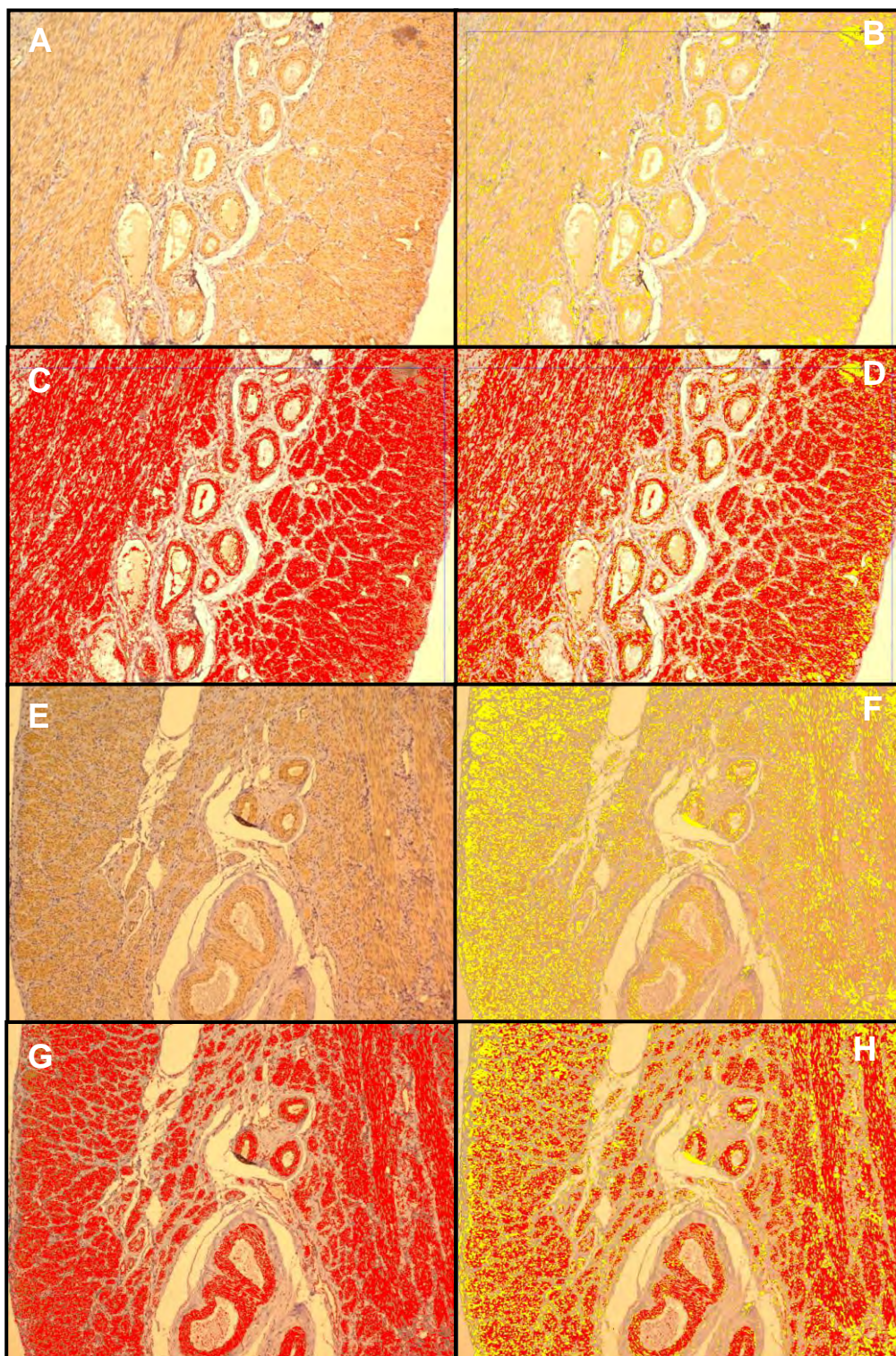


Figura 9. Análise morfométrica de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva na região do miométrio do **cornu uterino e corpo do útero**, das fêmeas caninas, 10x. (A e E) expressão da proteína nas fibras musculares lisas e fibroblastos, (B e F) seleção do núcleo das células que expressaram a proteína, (C e G) seleção do citoplasma das células com marcação positiva, (D e H) identificação da área nuclear e citoplasmática das células com expressão do CYR61.

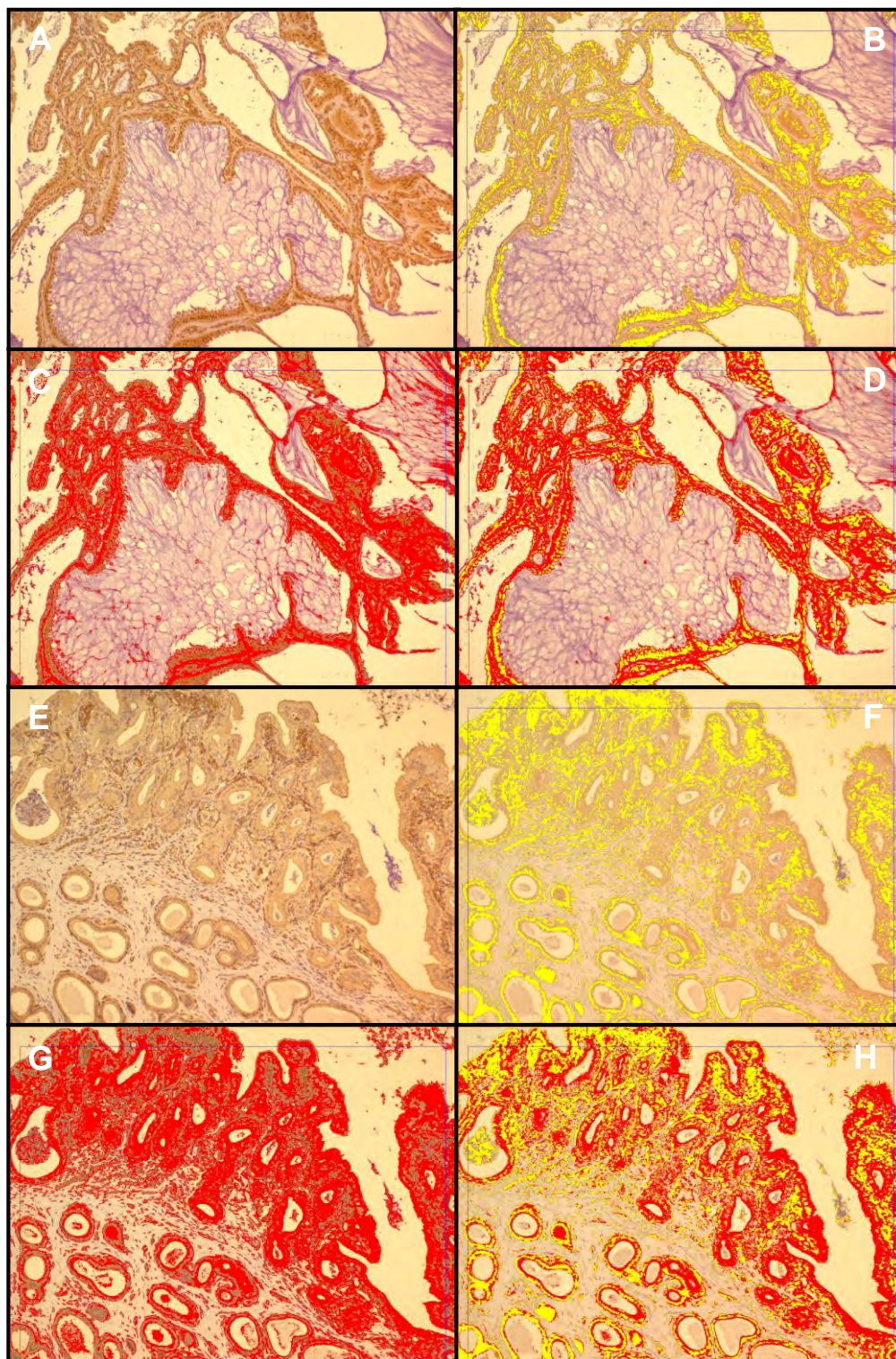


Figura 10. Análise morfométrica de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva na região do endométrio do **cornu uterino e corpo do útero**, das fêmeas caninas acometidas por piometra, 10x. (A e E) expressão da proteína no epitélio de revestimento, glândulas endometriais e fibroblastos, (B e F) seleção do núcleo das células que expressaram a proteína, (C e G) seleção do citoplasma das células com marcação positiva, (D e H) identificação da área nuclear e citoplasmática das células com expressão do *CYR61*.

Para análise estatística, as variáveis área e porcentagem de área dos componentes estruturais, endométrio e miométrio (AENDC, PAENDC, AMIOC, PAMIOC, AC e PAC) referentes ao corno uterino e corpo do útero; AC e PAC, referentes aos ovários e tubas uterinas, foram analisadas a partir de um experimento fatorial com dois fatores (fase e componente do órgão). O fator fase possuía seis níveis (proestro, estro, diestro, anestro, pré-púbere, e piometra) e o fator estrutura do órgão possuía quatro níveis (ovário, corno uterino, corpo do útero e tuba uterina). Para as variáveis AC e PAC não havia o fator componente estrutural do órgão, portanto a análise de variância foi utilizada para testar a diferença entre fases.

Em ambas as análises, quando havia diferença significativa entre médias, a comparação entre elas era efetuada pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.



## **V. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Determinação da fase do ciclo estral**

As fêmeas rigorosamente selecionadas nas diferentes fases do ciclo estral apresentavam citologia vaginal e dosagens hormonais características com a descrição da literatura (JOHNSTON et al., 2001). As fêmeas na fase intermediária do proestro apresentavam citologia vaginal contendo raros neutrófilos, hemácias, 5% de células parabasais, 20% de células intermediárias, 65% de células superficiais nucleadas e 10% de células superficiais anucleadas; dosagem de progesterona entre 0,5 e 5ng/mL e de estradiol entre 10 e 200pg/mL. As fêmeas na fase inicial do estro apresentavam raras hemácias, 90% de células superficiais anucleadas e 10% de células superficiais nucleadas; dosagem de progesterona entre 3 e 7ng/mL e de estradiol entre 8 e 60pg/mL. As fêmeas nas primeiras três semanas da fase de diestro apresentavam neutrófilos, 10% de células parabasais, 75% de células intermediárias (incluindo células espumosas) e 15% de células superficiais nucleadas; dosagem de progesterona acima de 7ng/mL e de estradiol entre 5 e 100pg/mL. As fêmeas na fase intermediária de anestro apresentavam 85% de células parabasais e 15% de células intermediárias; dosagem de progesterona inferior a 3ng/mL e de estradiol entre 5 e 200pg/mL. As fêmeas pré-púberes apresentavam citologia vaginal com células parabasais em pequena quantidade; dosagem de progesterona inferior a 3ng/mL e de estradiol inferior a 5pg/mL.

### **5.2 Análise morfológica e histopatológica**

A estrutura histológica dos órgãos genitais de fêmeas domésticas estão bem retratadas por BANKS (1992), BACHA & BACHA (2003), HIB (2003), DYCE et al., (2004); HAFEZ & HAFEZ (2004) e JUNQUEIRA & CARNEIRO (2008), mas estudos detalhando as alterações morfológicas nos órgãos reprodutores de

fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra não são encontrados na literatura. AUGSBURGER & KURZI (2004) realizaram estudos comparativos entre cadelas da raça Beagle, nulíparas e múltíparas e MONTEIRO et al. (2009) analisaram os efeitos do uso de contraceptivos nos órgãos reprodutores de fêmeas caninas.

As análises de HE permitiram a verificação da influência dos hormônios ovarianos na morfologia dos órgãos reprodutores de fêmeas caninas e serviram de controle para análise das lâminas de imunohistoquímica com marcação positiva de CYR61.

### 5.2.1 Ovários

A grande prevalência de folículos primordiais, com um oócito rodeado por uma camada de células somáticas (pré-granulosa) achatadas, e folículos primários, com a única camada de células da granulosa ao redor do oócito composta de células com formato cuboidal, na região cortical, próximo à túnica albugínea, nos ovários das fêmeas pré-púberes são semelhantes aos encontrados em mulheres antes da menarca (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008), folículos secundários e folículos de *Graaf* foram encontrados em pouca quantidade em fêmeas com idade próxima a puberdade. As fêmeas caninas na fase de proestro, estro, diestro e anestro apresentaram folículos ovarianos nos diferentes estágios de desenvolvimento, em quantidades variáveis, assim como encontrado em mulheres durante o ciclo menstrual. Na fase de estro foi encontrado corpo lúteo em formação, em pequena quantidade e na fase de diestro foram encontrados numerosos corpo lúteo ocupando grande parte da camada cortical dos ovários, como em mulheres após a ovulação no 14<sup>o</sup> dia de um ciclo de 28 dias, composto de células luteínicas tecais (CLT), em menor quantidade, e células luteínicas da camada granulosa (CLG), ovaladas. Os ovários em diestro apresentaram em pequena quantidade folículos de diferentes estágios de desenvolvimento, como folículos primários, folículos primários multilaminar, folículos secundários e

folículos terciários em menor quantidade, visto que grande parte do córtex ovariano era preenchida corpo lúteo em quase sua totalidade. Na fase intermediária e final de diestro foram encontrados corpo lúteo em degeneração, como em mulheres no final do ciclo menstrual, onde as células luteínicas sofrem degeneração por apoptose, fagocitose por macrófagos e invasão de fibroblastos vizinhos da região cortical, produzindo cicatriz de tecido conjuntivo denso, com grande quantidade de colágeno (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003; HIB, 2003; DYCE et al., 2004; HAFEZ & HAFEZ, 2004 e JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). As fêmeas caninas acometidas por piometra apresentavam características histológicas ovarianas semelhantes às fêmeas em fase de diestro, visto que esta afecção ocorre comumente nesta fase (NOAKES et al., 2001). Os ovários das fêmeas acometidas por piometra apresentaram característica especial de irregularidade na superfície e formação de lamelas exageradas, preenchidas por túnica albugínea e região cortical ovariana com folículos, como apresentado na Figura 11.

Na fase de anestro foram encontrados folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, como folículos primários, folículos primários multilaminar, pequena quantidade folículos secundários e folículos terciários, como em mulheres no final do ciclo menstrual (HIBS, 2003; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

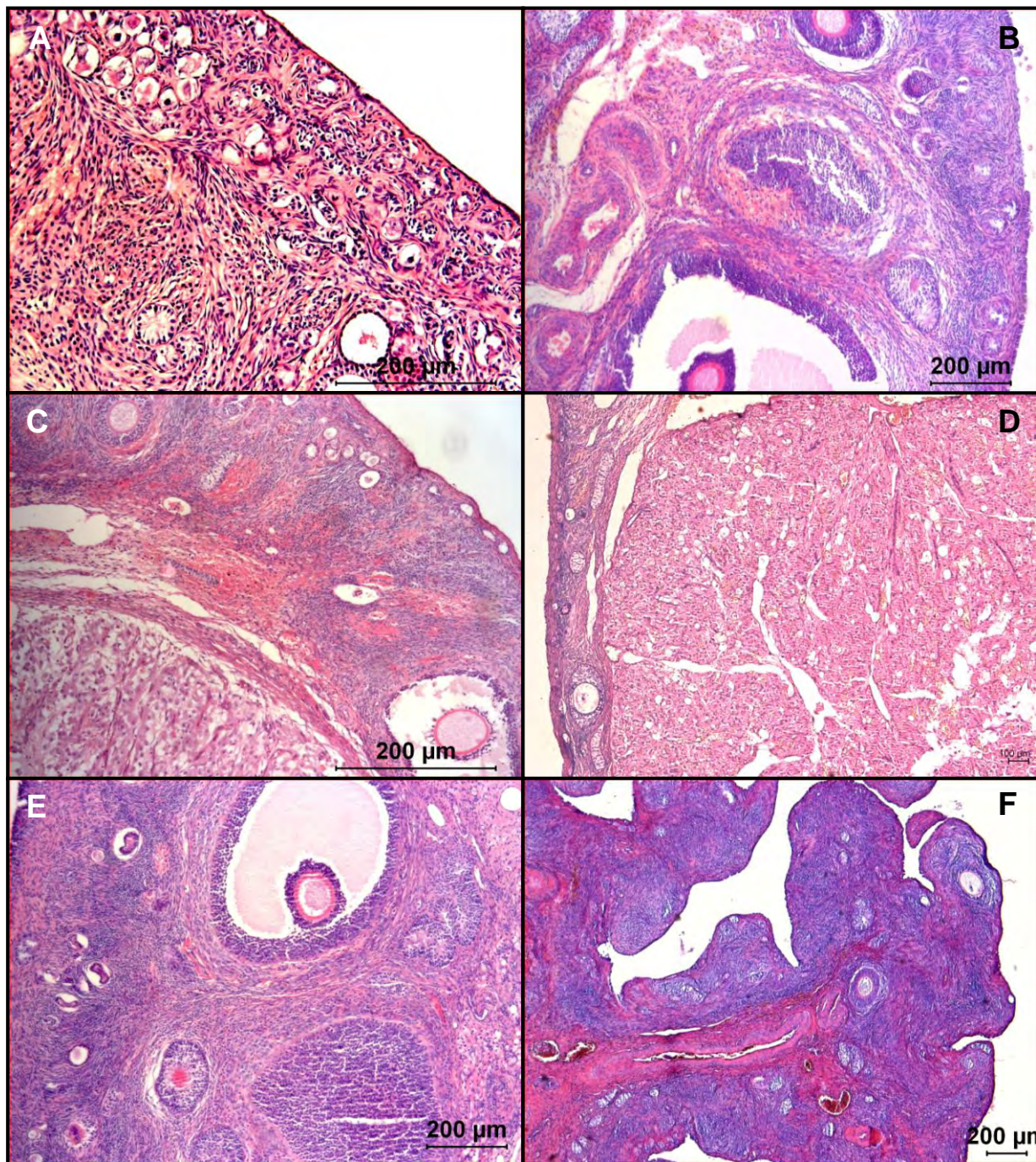


Figura 11. Análise morfológica de **ovário**, das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra, 5x, 10x e 20x. (A) fêmea pré-púbere, 20x, (B) fêmea na fase de próestro, 10x, (C) fêmea na fase de estro, 10x, (D) fêmea na fase de diestro, 5x, (E) fêmea na fase de anestro, 10x e, (F) fêmea acometida por piometra, 5x.

### 5.2.2 Corno Uterino e Corpo do Útero

As fêmeas caninas pré-púberes apresentaram miométrio pouco desenvolvido, com pouca quantidade de fibras musculares, delgadas e alongadas, e grande quantidade de tecido conjuntivo. A lâmina própria apresentou grande quantidade de células fusiformes, grande quantidade de fibras reticulares (tecido conjuntivo frouxo) e pouca quantidade de glândulas endometriais, pouco desenvolvidas. O endométrio nesta fase é revestido por epitélio cilíndrico simples.

Nas fases de proestro e estro, o endométrio torna-se espesso, as glândulas se desenvolvem e aumentam de tamanho, e as células epiteliais luminiais da fase de anestro tornam-se colunares. O epitélio que recobre o endométrio nas fêmeas caninas na fase de anestro é cúbico simples, na fase de diestro é cilíndrico simples com células secretoras e células ciliadas, com grande quantidade de núcleos extrudados. O endométrio na fêmea canina em anestro é delgado e possui pouca quantidade de glândulas endometriais, distribuídas na camada basal da lâmina própria, camada mais próxima ao miométrio circular; nas fêmeas em diestro o endométrio apresenta-se muito desenvolvido, com grande quantidade de fibroblastos na lâmina própria, grande quantidade de glândulas endometriais, bem desenvolvidas, espalhadas na camada basal e camada funcional (mais próxima ao epitélio de revestimento) da lâmina própria. As células que compõem as glândulas endometriais nas fêmeas em diestro são secretoras e ciliadas e nas fêmeas caninas em anestro são secretoras não ciliadas, como apresentado nas Figuras 12 e 13.

As fêmeas caninas acometidas por piometra sem distensão exagerada do corno uterino apresentaram miométrio com fibras musculares estreitas com aumento das fibras de colágeno e camada de tecido conjuntivo frouxo, proporcionando espessamento do miométrio como um todo; apresentaram aumento das fibras reticulares do tecido conjuntivo frouxo da lâmina própria, com grande quantidade de glândulas endometriais contendo células hiperplásicas, epitélio de revestimento cilíndrico com células secretoras hiperplásicas, com

grande quantidade de vacúolos citoplasmáticos. As fêmeas caninas acometidas por piometra com distensão exagerada do corno uterino apresentaram aumento exacerbado das fibras de colágeno e tecido conjuntivo frouxo no miométrio, com pequena quantidade de fibras musculares lisas, reduzindo significativamente a espessura do miométrio como um todo; apresentaram grande quantidade de fibroblastos e polimorfonucleares na lâmina própria, endométrio reduzido com perda da característica anatômica da estrutura em questão, com grande quantidade de glândulas endometriais compostas de células secretoras hiperplásicas, contendo numerosos vacúolos citoplasmáticos e vasos sanguíneos distribuídos na lâmina própria, epitélio colunar secretor hiperplásico contendo numerosos vacúolos citoplasmáticos, grande quantidade de polimorfonucleares e bactérias, como apresentado nas Figuras 12, 13 e 14.

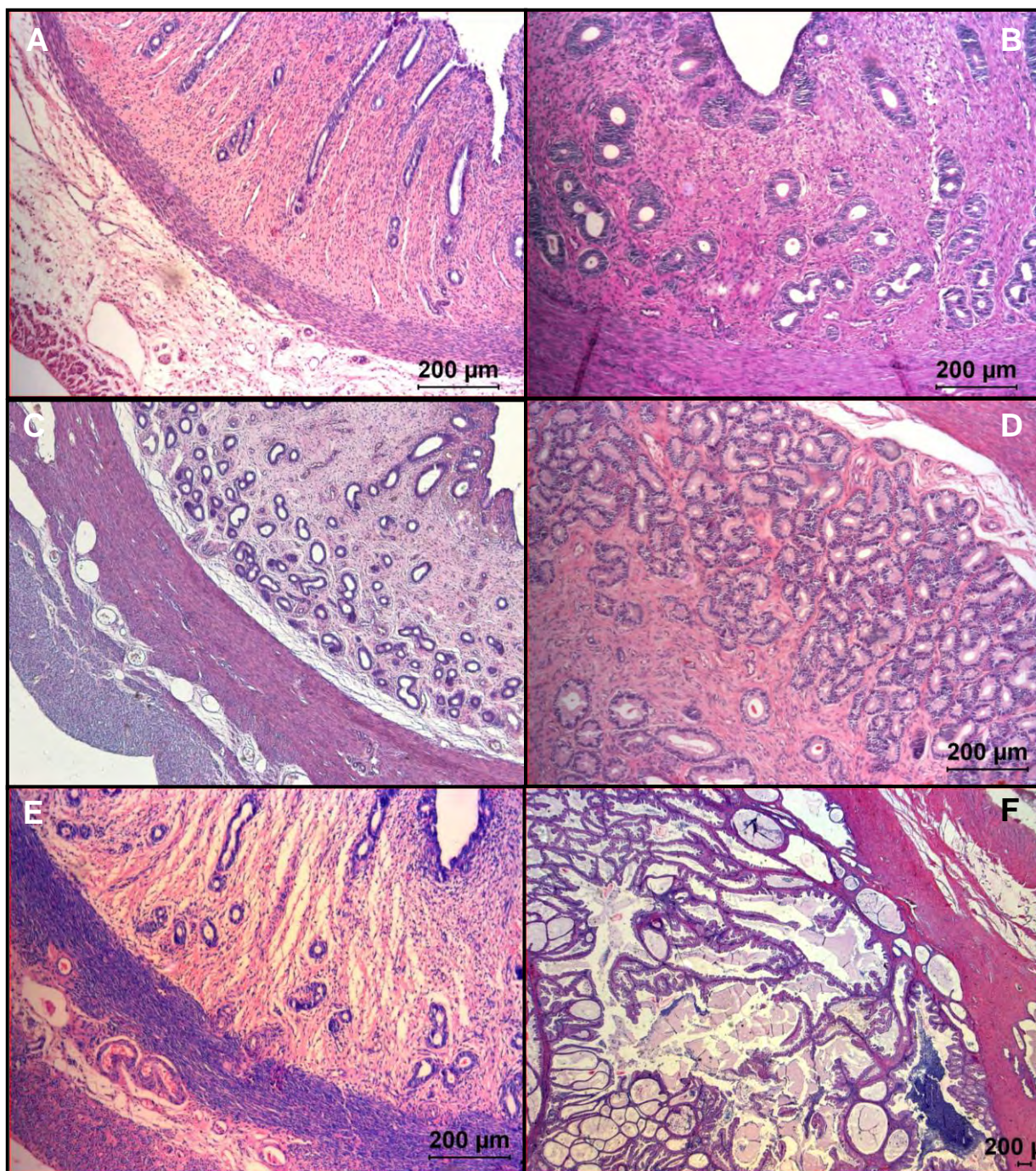


Figura 12. Análise morfológica de **cornio uterino**, das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra, 1,6x e 10x. (A) fêmea pré-púbere, 10x, (B) fêmea na fase de próestro, 10x, (C) fêmea na fase de estro, 10x, (D) fêmea na fase de diestro, 10x, (E) fêmea na fase de anestro, 10x e, (F) fêmea acometida por piometra, 1,6x.

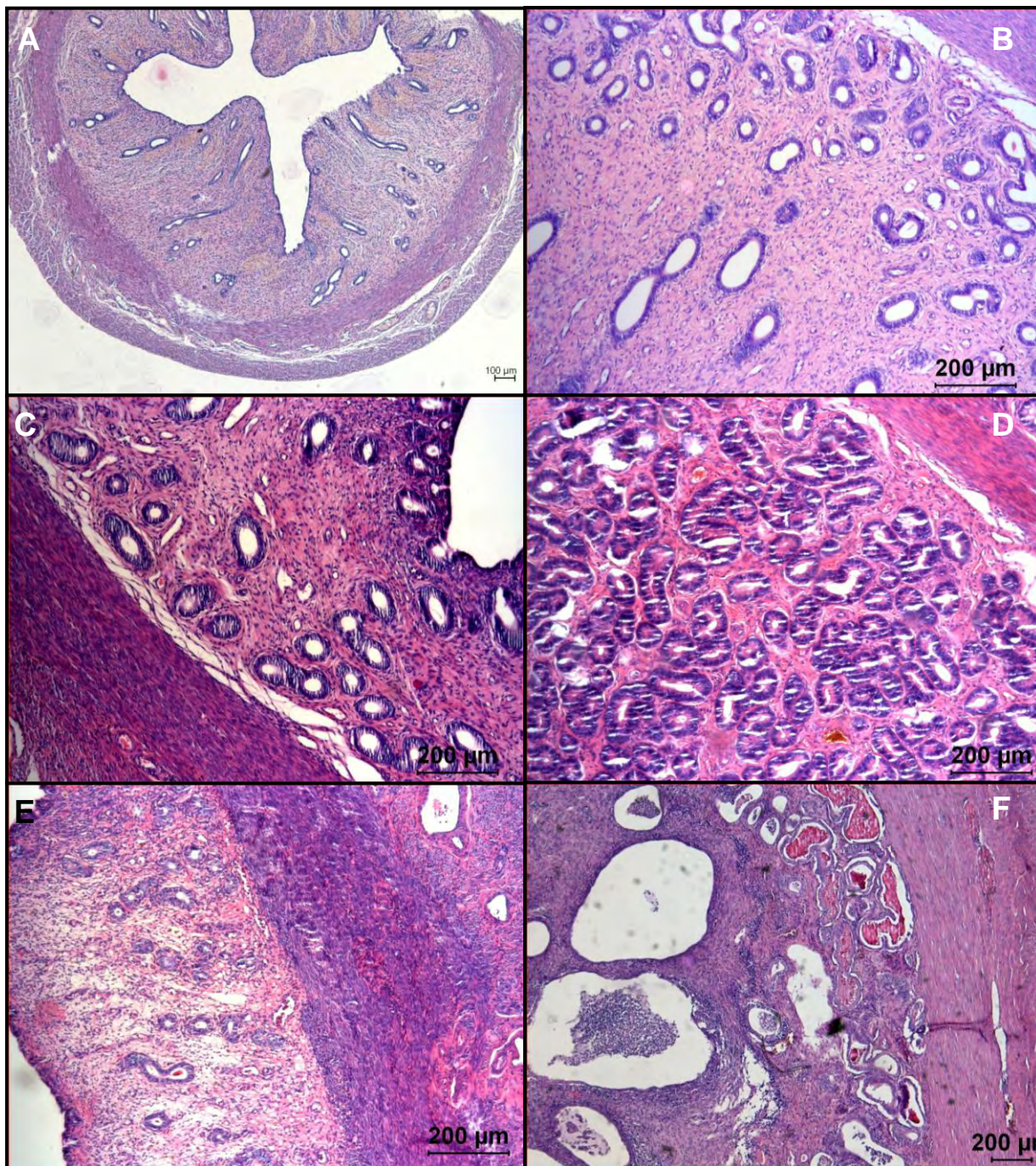


Figura 13. Análise morfológica de **corpo uterino**, das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra, 4x, 5x e 10x. (A) fêmea pré-púbere, 4x, (B) fêmea na fase de próestro, 10x, (C) fêmea na fase de estro, 10x, (D) fêmea na fase de diestro, 10x, (E) fêmea na fase de anestro, 10x e, (F) fêmea acometida por piometra, 5x.



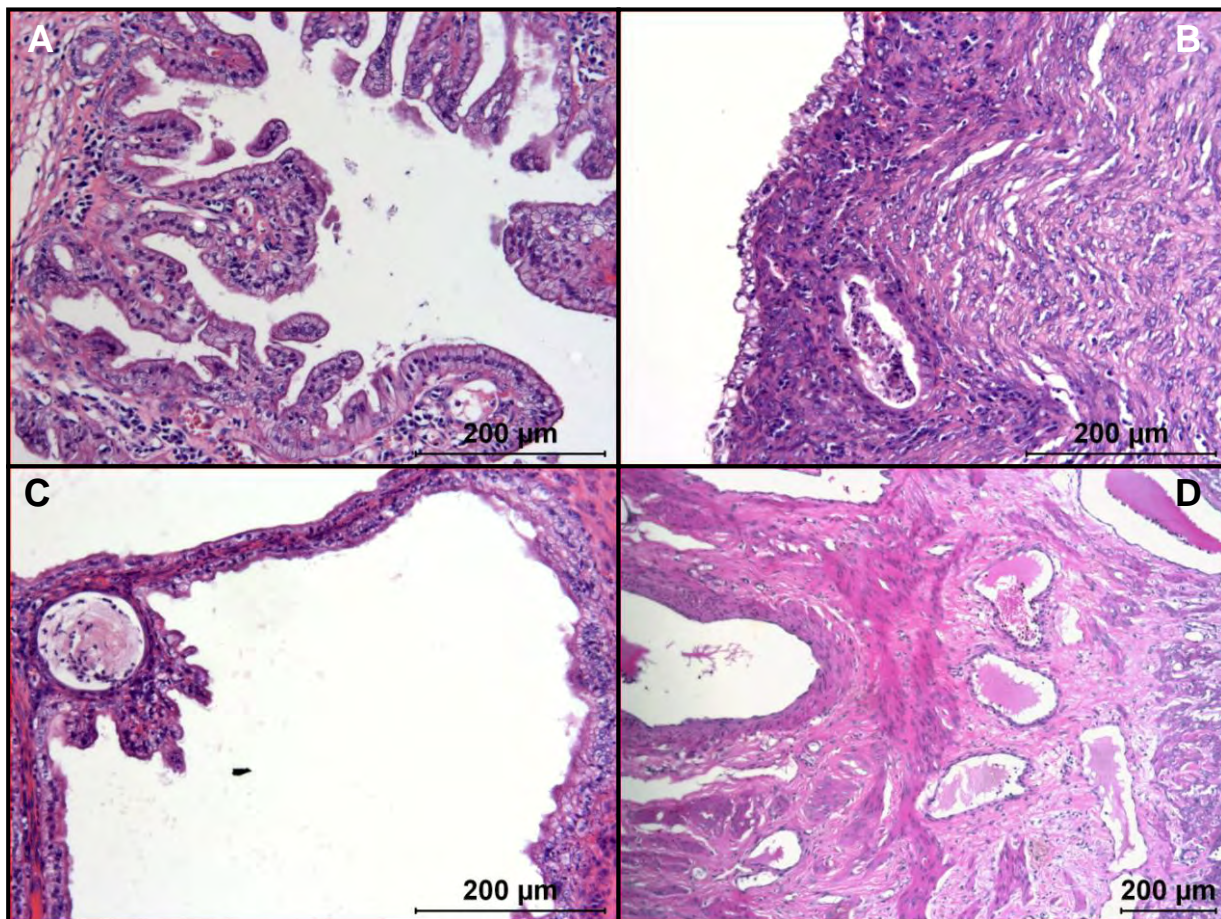


Figura 14. Análise morfológica de **cornu uterino** das fêmeas caninas acometidas por hiperplasia endometrial cística e/ou piometra, 10x e 40x. (A) epitélio de revestimento hiperplásico e hipertrofiado, alta atividade secretória, 40x, (B) destruição endometrial e alterações na morfologia do miométrio, 40x, (C) epitélio das glândulas endometriais hiperplásicas, hipertrofiadas e com alta atividade secretora caracterizando hiperplasia cística, 40x, (D) destruição miometrial com redução na quantidade e tamanho das fibras musculares lisas e proliferação de tecido conjuntivo entremeadado, 10x.

### 5.2.3 Tuba Uterina

As tubas uterinas das fêmeas pré-púberes apresentaram-se pouco desenvolvidas, com ausência de cílios no epitélio cilíndrico e pouca quantidade de pregas. A camada mucosa formada pelas pregas mostrou-se pouco desenvolvida, com altura inferior às fêmeas caninas nas diversas fases do ciclo estral.

As tubas uterinas das fêmeas em proestro e estro apresentavam cílios bastante desenvolvidos e em maior quantidade e pregas bem desenvolvidas. As tubas uterinas das fêmeas caninas em fase inicial de diestro apresentavam cílios longos e numerosos, já em fase final de diestro, os cílios eram menores e menos numerosos. As fêmeas caninas em anestro e acometidas por piometra apresentavam cílios pequenos e em pequena quantidade, como apresentado na Figura 15.

As alterações na morfologia deste órgão são explicadas por suas funções principais de captura dos óvulos liberados e condução dos mesmos ao útero, transporte de espermatozóides e promoção de condições satisfatórias para que ocorra a fertilização em seu interior, após a fase ovulatória, caracterizada pelo estro na fêmea canina, como apresentado na Figura 15.

Foram coletados fragmentos da ampola e istmo, confirmando as diferenças no desenvolvimento miometrial, tamanho e quantidade de pregas na lâmina própria e quantidade de cílios, de acordo com a proximidade com o corno uterino ou ovário, como descrito na literatura por BACHA & BACHA (2003), HIB (2003) e JUNQUEIRA & CARNEIRO (2008).

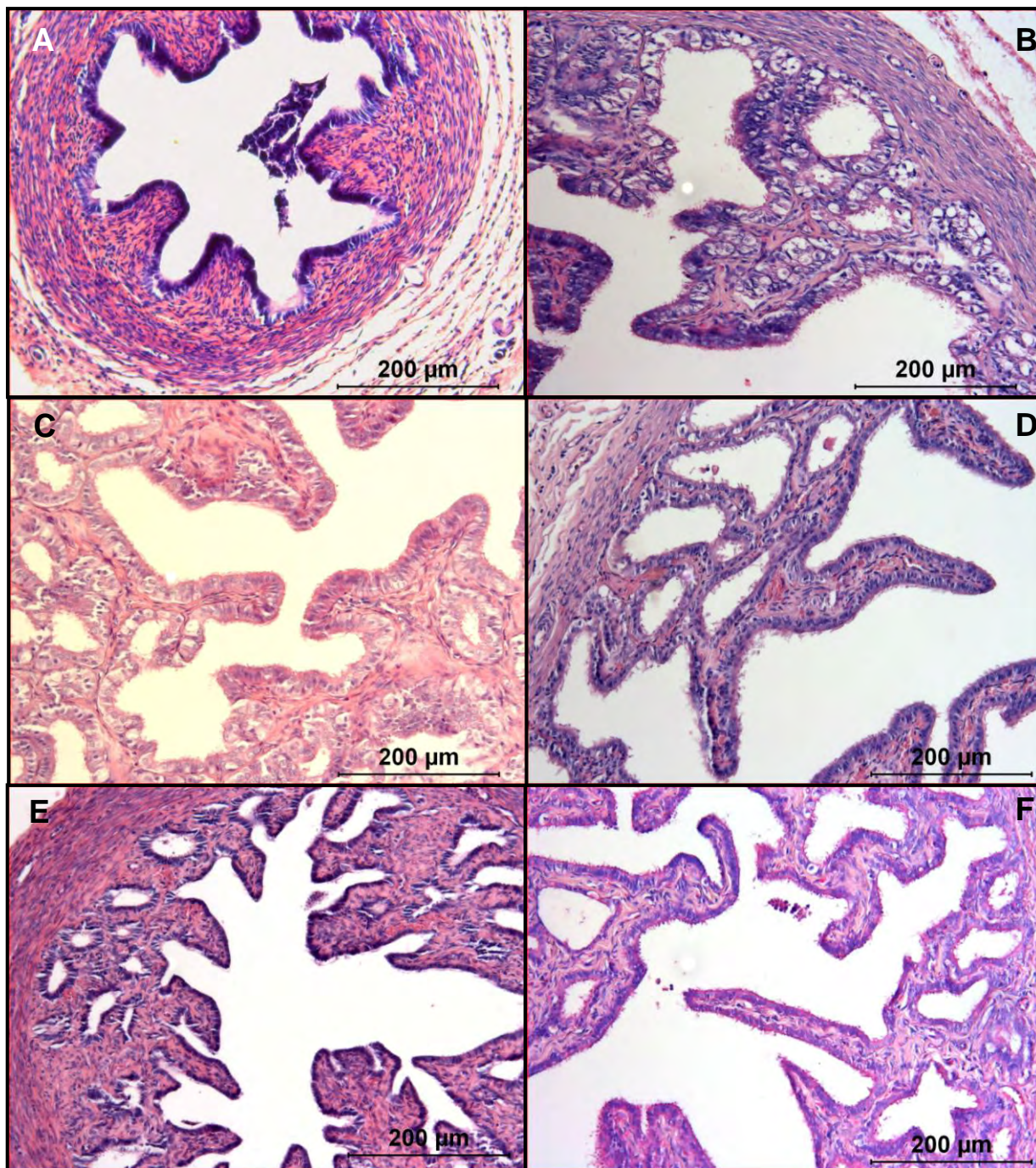


Figura 15. Análise morfológica de **tuba uterina**, das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra, 20x. (A) fêmea pré-púbera (B) fêmea na fase de próestro, (C) fêmea na fase de estro, (D) fêmea na fase de diestro, (E) fêmea na fase de anestro e, (F) fêmea acometida por piometra.

### 5.3 Dosagens séricas de progesterona e estradiol

A Tabela 1 apresenta valores de  $p \leq 0,05$  para as dosagens séricas de progesterona e estradiol, de fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral, fêmeas pré-púberes e acometidas por piometra, demonstrando diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 1. Valores de p obtidos pelo teste de Tukey a 5% de significância, para as variáveis progesterona e estradiol comparadas entre fases.

Variáveis analisadas	p Fase
<b>P4</b>	<0,0001
<b>E2</b>	<0,0001

$p \leq 0,05$  diferem significativamente pelo teste de Tukey.

Os valores séricos extremos de progesterona e estradiol nas diferentes fases do ciclo estral resultaram em altos valores de coeficiente de variação. Para reduzir esse efeito e melhorar a análise estatística, aplicaram-se na análise os valores transformados de P4 e E2, obtidos por meio das fórmulas:

$$P4T = \log (P4 + 0,5) \quad \text{e} \quad E2T = \log (E2 + 0,5)$$

Para os valores obtidos de P4, o teste de Tukey mostrou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as fases de pró-estro, estro, diestro, anestro e piometra. O grupo de fêmeas da fase de proestro não diferiu das fêmeas pré-púberes, como demonstrado na Tabela 2, que pode ser explicado devido à inatividade sexual das fêmeas pré-púberes, decorrente de imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, e valores séricos basais de progesterona encontrados nas fêmeas na fase de proestro. A concentração plasmática de P4 começa a se elevar gradativamente no final do proestro, concomitante com a redução nos valores de estradiol, devido à luteinização pré-ovulatória das células foliculares que aumenta acentuadamente após a ovulação (CONCANNON et al.,

1975; ROOT KUSTRITZ, 2001) atingindo pico máximo de 15 a 60 ng/mL duas a três semanas após o início deste estágio, o qual persiste por uma a duas semanas, declinando gradualmente até atingir valores basais no final do diestro (ETTINGER, 1992). Os resultados de progesterona obtidos neste experimento foram semelhantes aos descritos por ETTINGER (1992), VALTONEN & JALKANEN (1993) e JOHNSTON et al. (2001), com concentrações plasmáticas de 0,2 a 2ng/mL na fase de proestro, 5 a 10ng/mL na fase de estro, 10 a 50ng/mL na fase de diestro e concentrações inferiores a 1ng/mL na fase de anestro. As fêmeas acometidas por piometra diferiram significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) das fêmeas na fase de diestro com relação às concentrações plasmáticas de progesterona, devido ao fato das fêmeas acometidas por piometra serem diagnosticadas normalmente no final da fase de diestro, e as fêmeas selecionadas para o grupo de cadelas normais deste experimento, se encontravam nas primeiras três semanas da fase de diestro, com citologia vaginal e dosagem de progesterona bem característica, na fase de manutenção dos valores máximos.

Tabela 2. Médias, desvio padrão, valores mínimos e valores máximos de progesterona, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra. Teste de Tukey para comparação das médias, a 5% de significância.

Fase	Média (ng/mL)	Desvio padrão	Valores mínimos (ng/mL)	Valores máximos (ng/mL)
<b>Pré-púbere</b>	1,44 <b>D</b>	± 0,74	0,4	2,5
<b>Proestro</b>	1,95 <b>D</b>	± 1,58	0,4	5,0
<b>Estro</b>	5,3 <b>C</b>	± 1,03	3,3	6,5
<b>Diestro</b>	21,54 <b>A</b>	± 13,32	6,5	51,5
<b>Anestro</b>	1,06 <b>E</b>	± 0,79	0,1	2,9
<b>Piometra</b>	13,76 <b>B</b>	± 15,17	0,7	60,0

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Para os valores obtidos de E2, o teste de Tukey mostrou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as fêmeas pré-púberes, fase de proestro, estro, diestro

e anestro. O grupo de fêmeas acometidas por piometra não diferiu das fêmeas em diestro e anestro, como demonstrado na Tabela 3.

Cerca de um mês antes do início do proestro ocorre uma ligeira elevação da concentração de estradiol, produzidos pelos folículos em crescimento, resultando em manifestação clínica do início da fase folicular (CONCANNON et al., 1975; ROOT KUSTRITZ, 2001). O início do proestro está associado a concentrações de estrógeno acima de 25pg/ml, atingindo o pico máximo com concentrações em torno de 60 a 70 pg/ml, 24 a 48 horas antes do término do mesmo (FELDMAN & NELSON, 1996). Esta onda de estrógeno dura de um a dois dias e precede o pico pré-ovulatório do LH (VALTONEN e JALKANEN, 1993), retornando progressivamente às concentrações basais (15pg/ml) durante os próximos 5 a 20 dias (ETTINGER, 1992). As concentrações plasmáticas de estrógeno encontradas neste experimento nas diferentes fases do ciclo estral foram semelhantes às descritas na literatura por SLATTER (2007), JOHNSON (1995) e NOAKES et al. (2001), que demonstraram 50 a 100pg/mL de estrógeno em fêmeas na fase de proestro, 5 a 200pg/mL na fase de estro, 5 a 20pg/mL na fase de diestro e 5 a 20pg/mL na fase de anestro. As fêmeas acometidas por piometra apresentaram valores plasmáticos semelhantes significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) às fêmeas na fase de diestro e anestro, devido ao fato das fêmeas doentes apresentarem o distúrbio mais comumente no diestro e anestro (SLATTER, 2007; JOHNSON, 1995; NOAKES et al., 2001), períodos caracterizados por valores basais de estrógeno (5-20pg/mL). Após o pico deste hormônio que antecede a ovulação, ocorre queda gradual dos valores séricos no final da fase de estro e início de diestro, mantendo valores basais da terceira semana de diestro até o final da fase de anestro, justificando a semelhança encontrada neste experimento.

A Tabela 3 apresenta os valores mínimos, valores máximos, média e desvio padrão, dos valores séricos de estradiol nas fêmeas caninas deste experimento, nas diferentes fases do ciclo estral, fêmeas pré-púberes e acometidas por piometra, e teste de Tukey para comparação das médias, a 5% de significância.

Tabela 3. Médias, desvio padrão, valores mínimos e valores máximos de estradiol, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra. Teste de Tukey para comparação das médias, a 5% de significância.

<b>Fase</b>	<b>Média (pg/mL)</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Valores mínimos (pg/mL)</b>	<b>Valores máximos (pg/mL)</b>
<b>Pré-púbere</b>	5,0 <b>F</b>	-	5,0	5,0
<b>Proestro</b>	49,71 <b>B</b>	± 47,05	10,9	173,6
<b>Estro</b>	77,07 <b>A</b>	± 57,58	8,6	52,4
<b>Diestro</b>	30,70 <b>C</b>	± 1,47	5,0	78,4
<b>Anestro</b>	27,14 <b>D</b>	± 48,40	5,0	181,4
<b>Piometra</b>	31,9 <b>CD</b>	± 41,8	5,0	146,7

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

As Figuras 16 e 17 apresentam os valores séricos de progesterona e  $17\beta$ -estradiol, nas fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra.

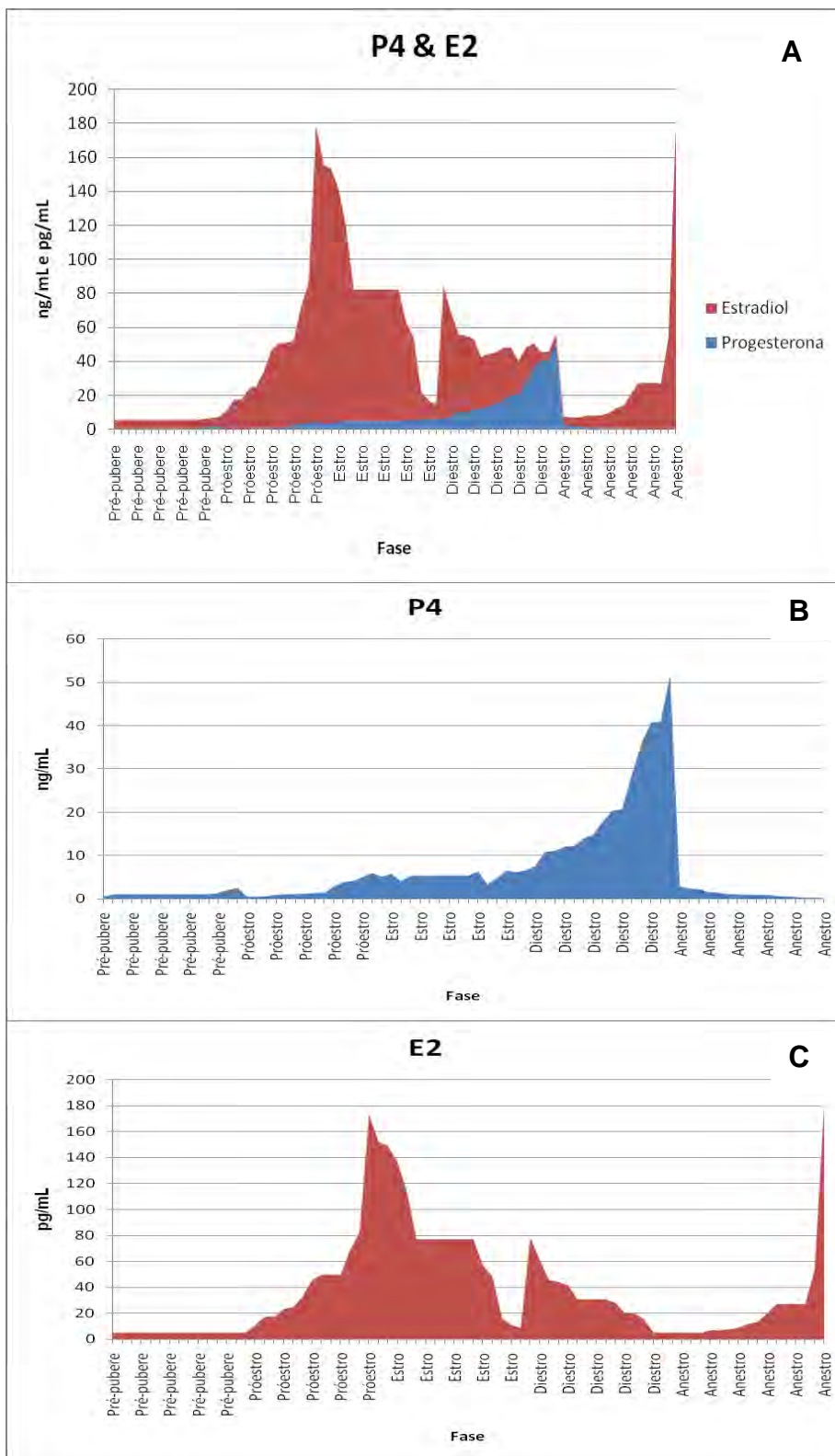


Figura 16. (A) Valores séricos de P4 e E2 nas fêmeas caninas pré-púberes e nas diferentes fases do ciclo estral, (B) valores séricos de P4 e, (C) valores séricos de E2.



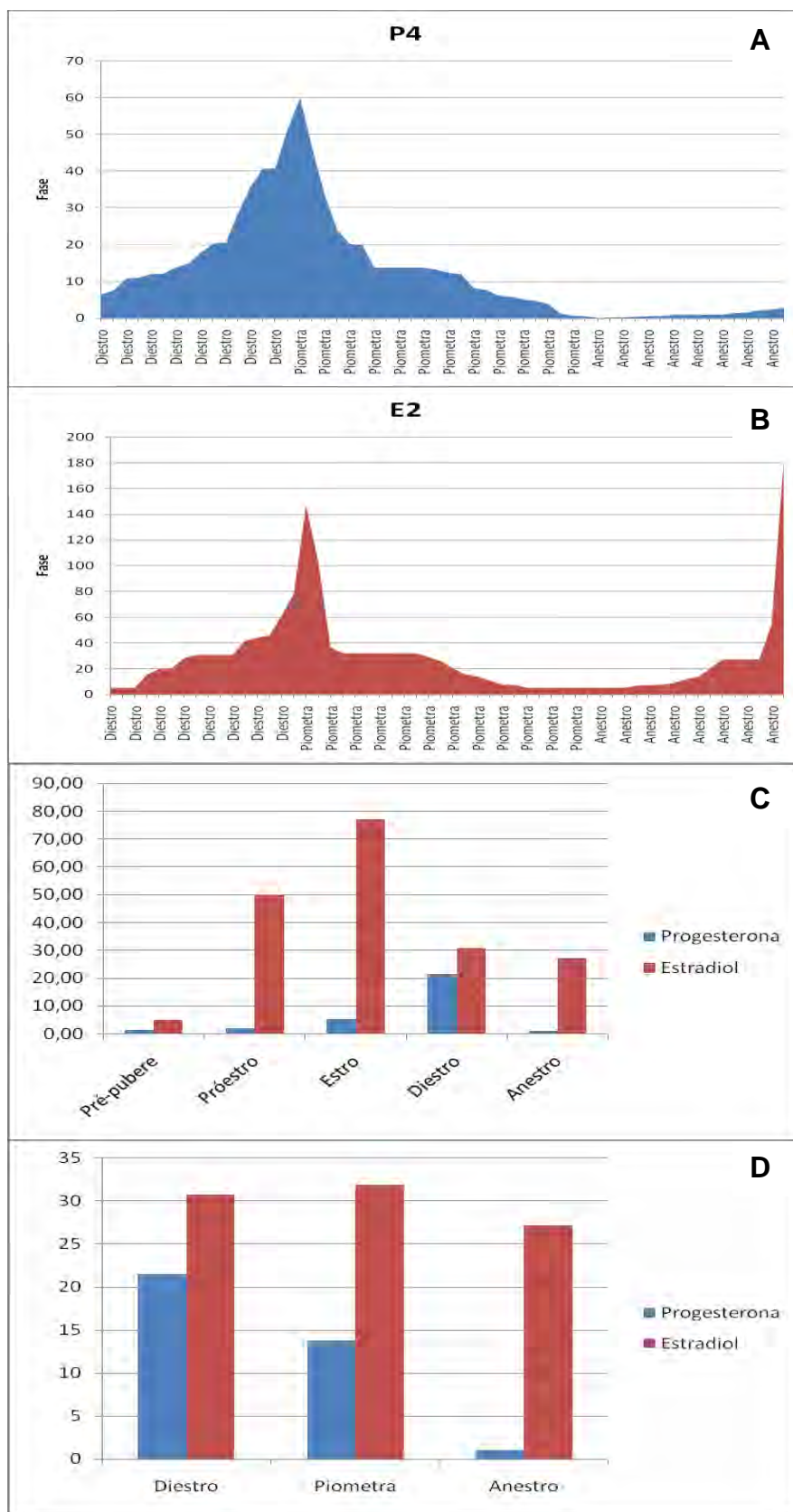


Figura 17. Valores séricos de P4 e E2. (A) valores de P4 nas fases de diestro, anestro e piometra, (B) valores de E2 nas fases de diestro, anestro e piometra (C) média dos valores de P4 e E2 nas fases do ciclo estral e, (D) média dos valores de P4 e E2 nas fases de diestro, anestro e piometra.

#### 5.4 Análise de imunistoquímica

Todos os fragmentos dos tecidos avaliados, de fêmeas normais em fase de proestro, estro, diestro e anestro, fêmeas pré-púberes e fêmeas acometidas por piometra, apresentaram marcação positiva citoplasmática para a proteína CYR61 nos componentes epiteliais secretores como glândulas endometriais no corno uterino e corpo do útero, epitélio de revestimento no endométrio do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, epitélio cúbico simples no ovário (epitélio germinativo), folículos ovarianos, corpo lúteo ativo e em regressão, *corpo albicans* e glândulas intersticiais, como demonstrado na Figura 18.

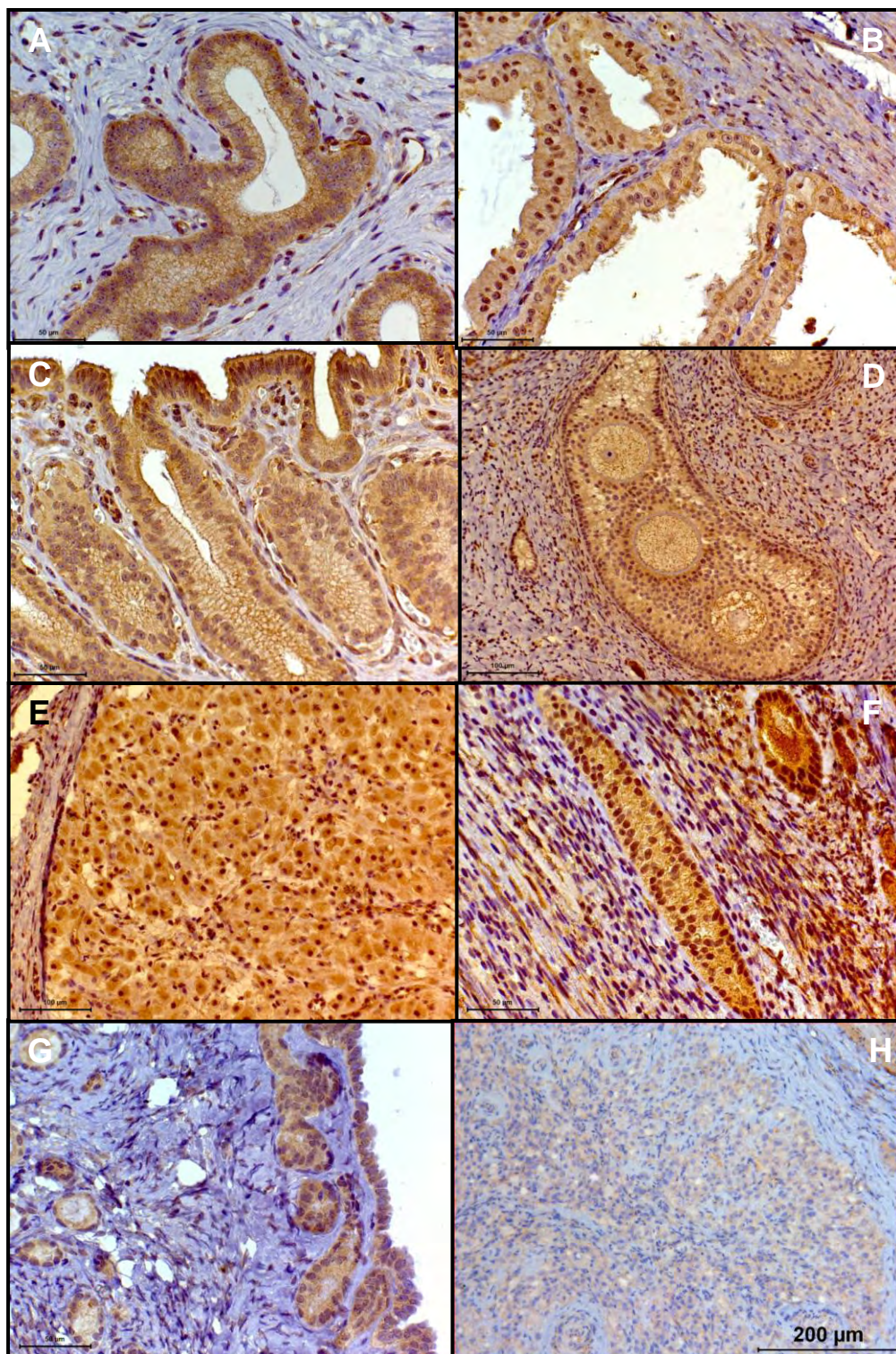


Figura 18. Marcação positiva do *CYR61* nos componentes epiteliais dos órgãos reprodutores das fêmeas caninas, 20x. (A) **Endométrio**: epitélio colunar simples das glândulas endometriais do corno uterino e corpo do útero, (B) **Endométrio**: epitélio colunar simples de revestimento, na tuba uterina, (C) **Endométrio**: epitélio colunar simples de revestimento no corno uterino e corpo do útero, (D) **Ovário**: folículos e fibroblastos da região cortical, (E) **Ovário**: corpo lúteo, (F) **Ovário**: glândulas intersticiais, (G) **Ovário**: folículos e epitélio cúbico simples e (H) **Ovário**: corpo *albicans*.

Os componentes estromais que apresentaram marcação citoplasmática positiva incluíram fibras musculares lisas, musculatura lisa das artérias e fibroblastos da lâmina própria do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina e região cortical dos ovários, com intensidades de marcação menor quando comparadas aos componentes epiteliais secretores, como demonstrado na Figura 19.

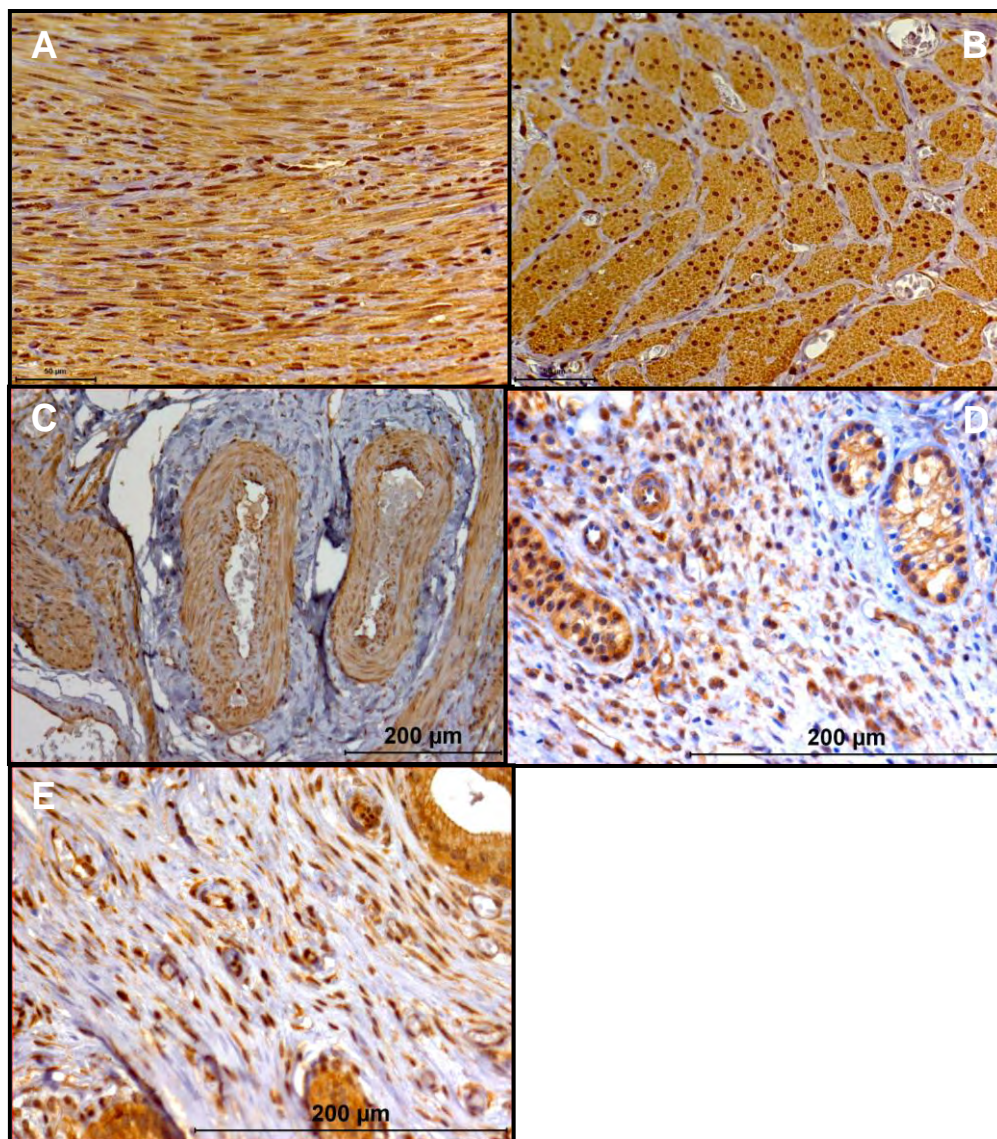


Figura 19. Marcação positiva do CYR61 nos componentes estromais dos órgãos reprodutores das fêmeas caninas, 20x e 40x. (A) **Miométrio**: células musculares lisas do miométrio longitudinal do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, (B) **Miométrio**: células musculares lisas do miométrio circular do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, (C) **Estrato vascular**: células musculares lisas dos vasos dos ovários, corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, (D) **Ovário**: fibroblastos da região cortical, (E) **Endométrio**: fibroblastos da lâmina própria.

Esses resultados são semelhantes aos resultados encontrados por SAKAMOTO et al. (2004), OLIVEIRA et al. (2006) e OLIVEIRA (2009), que demonstraram a expressão de CYR61 nas células epiteliais e estromais em próstata de homens, e cães respectivamente.

SAKAMOTO et al. (2004) afirmam que a expressão do CYR61 nas fibras de colágeno do tecido conjuntivo dos homens acometidos por HPB, é atribuída a secreção da proteína no estroma adjacente às células epiteliais em proliferação; e que a comparação na análise da intensidade de expressão no estroma e epitélio é útil para determinar se a hiperplasia prostática é de origem estromal, epitelial ou ambos, dependendo da região encontrada com maior expressão.

A marcação nos componentes epiteliais encontrados corresponderam às células epiteliais secretórias ou ciliadas dos órgãos reprodutores da fêmea canina, e a marcação nos componentes estromais corresponderam à musculatura lisa e fibroblastos neste experimento, como demonstrado por KIREEVA et al (1996), OLIVEIRA et al. (2006), SAKAMOTO et al. (2004), TAMURA et al. (2001) e OLIVEIRA (2009), que afirmam expressão do CYR61 em vários tipos celulares, como fibroblastos, células epiteliais e musculatura lisa.

Acredita-se que a presença desta proteína em determinadas células como fibroblastos, células endoteliais e musculatura lisa, seja a razão pela qual está intimamente ligada a processos angiogênicos, reparação tecidual, proliferação e adesão celular (BRIDGSTOCK, 1999).

Alguns componentes apresentaram marcação nuclear positiva, demonstrados na Figura 20 e Tabelas 19, 22, 25 e 28.

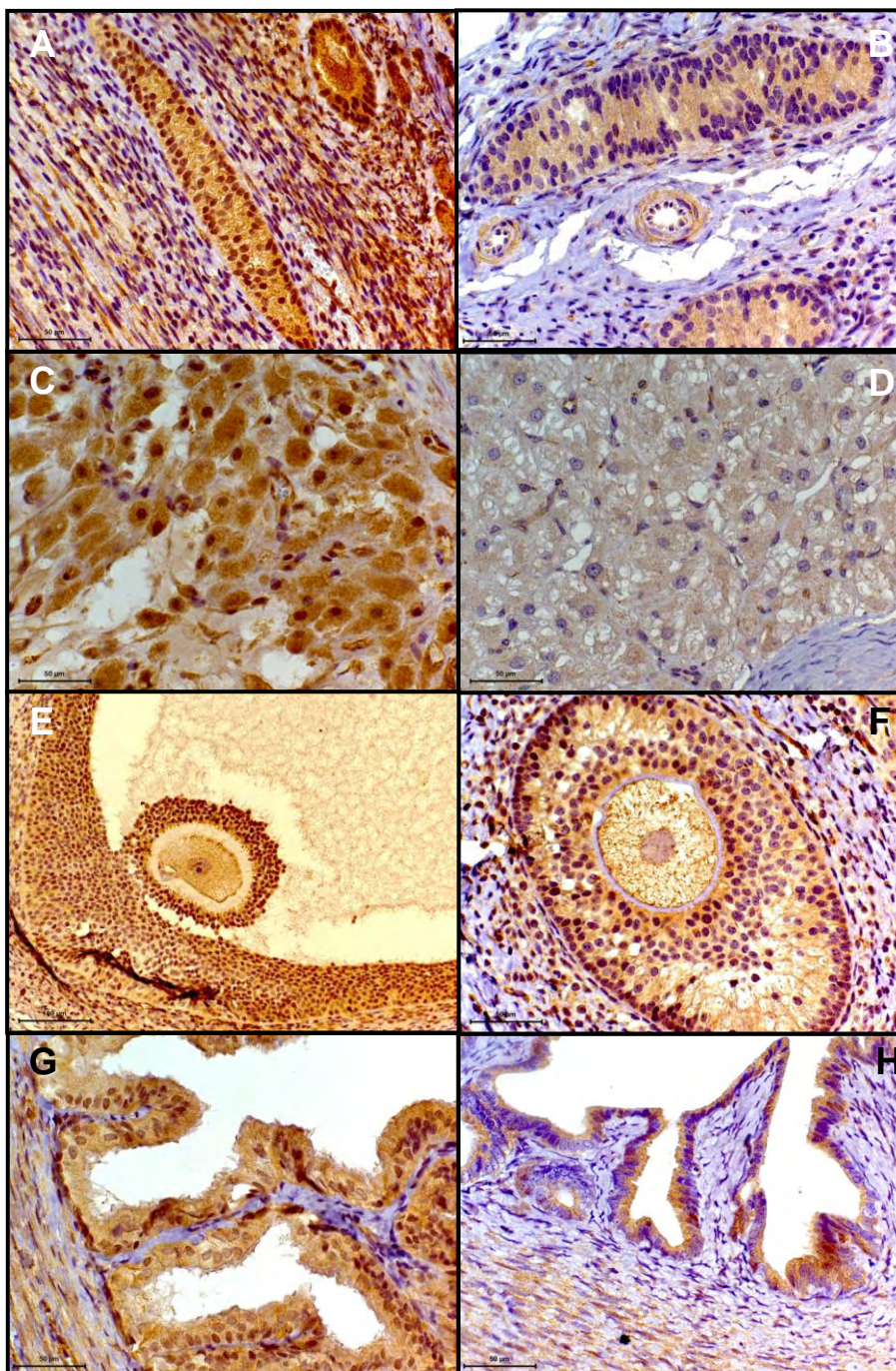


Figura 20. Marcação nuclear positiva e negativa do *CYR61* nos diferentes componentes dos órgãos reprodutivos das fêmeas caninas, 20x e 40x. (A, C, E) **Ovário**: marcação nuclear e citoplasmática positivas nas glândulas intersticiais, corpo lúteo e folículos, (B, D, F) **Ovário**: marcação citoplasmática positiva e nuclear negativa nas glândulas intersticiais, corpo lúteo e folículos, (G) **Tuba uterina**: marcação citoplasmática e nuclear positivas no epitélio de revestimento e, (H) **Tuba uterina**: marcação citoplasmática positiva e nuclear negativa no epitélio de revestimento.

A marcação do CYR61 foi positiva no núcleo e citoplasma dos componentes epiteliais e estromais dos órgãos reprodutores das fêmeas caninas deste experimento, semelhantes aos resultados encontrados por KIREEVA et al. (1997), TAMURA et al. (2001) e OLIVEIRA (2009), que demonstram marcação nuclear e citoplasmática positiva nos fibroblastos, células epiteliais e musculatura lisa em próstata de cães acometidos por HPB e neoplasia prostática, placenta durante o desenvolvimento embrionário e estudos em células de músculo liso.

Acredita-se que a marcação nuclear e citoplasmática pode ser explicada pelo fato da proteína CYR61 ser distribuída de forma diferente na matriz extracelular, em partes das células ou na superfície da mesma (YANG & LAU, 1991). Existe uma estreita relação da proteína e seus principais receptores e ligantes, e por isso, acredita-se que a proteína seja sintetizada perto de seu local de ação (KIREEVA et al., 1997). A marcação citoplasmática e nuclear encontrada com a utilização do anticorpo anti-CYR61, pode ocorrer devido à inespecificidade do anticorpo contra somente uma proteína ou epítipo antigênico desta proteína, resultando em reação cruzada, que pode ocorrer quando se utiliza anticorpo policlonal. Como as lâminas de controle negativo, utilizando imunoglobulinas de coelho, demonstraram ausência da expressão do CYR61, a marcação nuclear pode ter ocorrido devido à reação cruzada do anticorpo primário.

### 5.4.1 Análise de área e porcentagem de área com marcação positiva

As análises de área com marcação citoplasmática positiva (AC) e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva (PAC), demonstraram diferença significativa na comparação entre fases, entre órgãos reprodutores e entre fases e órgãos, pelo teste de Tukey com 5% de significância, como demonstrado nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Valores de p para as variáveis de marcação citoplasmática positiva das células da região cortical do ovário, endométrio e miométrio do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, comparadas entre fases, órgãos e fases x órgãos.

Variáveis analisadas	p Fase	p Estrutura	p Fase x Estrutura
<b>AC</b>	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<b>PAC</b>	<0,0001	0,0044	<0,0001

p≤0,05 diferem significativamente pelo teste de Tukey.

Tabela 5. Teste de Tukey para comparação das médias±desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva das células da região cortical do ovário, endométrio e miométrio do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, comparadas entre fases e piometra, a 5% de significância, em ordem de classificação da fase com menor marcação para a fase com maior marcação.

Fase	AC ( $\mu\text{m}^2$ )	PAC (%)
<b>Pré-púbere</b>	80773,61±79198,09 <b>C</b>	19,56±9,45 <b>E</b>
<b>Anestro</b>	265271,1±153673,76 <b>B</b>	27,77±12,35 <b>D</b>
<b>Proestro</b>	268364,15±164703,74 <b>B</b>	28,89±14,55 <b>CD</b>
<b>Estro</b>	289250,6±56152,02 <b>B</b>	32,59±14,5 <b>BC</b>
<b>Piometra</b>	335209,6±173480,39 <b>A</b>	34,46±13,5 <b>AB</b>
<b>Diestro</b>	336618,8±177906,42 <b>A</b>	36,26±13,73 <b>A</b>

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (p≤0,05).

A Tabela 6 demonstra diferença significativa, pelo teste de Tukey com 5% de significância, com relação às análises de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva (AC e PAC), entre os órgãos reprodutores analisados.



Tabela 6. Teste de Tukey para comparação das médias±desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva das células em todas as fases, comparando-se os órgãos reprodutores, a 5% de significância, em ordem de classificação do órgão com menor marcação para o órgão com maior marcação.

<b>Estrutura</b>	<b>AC (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Estrutura</b>	<b>PAC (%)</b>
<b>Tuba uterina</b>	82582,78±32707,77 C	<b>Corpo do útero</b>	28,99±14,46 B
<b>Corpo do útero</b>	286078,37±172123,82 B	<b>Ovário</b>	30,02±12,82 AB
<b>Corno uterino</b>	311153±183938,47 A	<b>Tuba uterina</b>	31,16±12,34 A
<b>Ovário</b>	318262,79±135905,92 A	<b>Corno uterino</b>	31,28±15,23 A

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os gráficos da Figura 21 demonstram relação linear positiva significativa ( $p \leq 0,05$ ) na fração de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do ovário, corno uterino, corpo do útero e tuba uterina (AC, PAC), para o anticorpo anti-CYR61 em relação aos valores séricos de progesterona; e os gráficos da Figura 22 demonstram relação linear neutra não significativa ( $p > 0,05$ ) com relação aos valores séricos de estradiol, demonstrando que quanto maior as concentrações séricas de progesterona, maior a fração de área com marcação positiva nos órgãos reprodutores, e que a variação nos valores de estradiol não exercem relação linear com a fração de área com marcação positiva nos órgãos reprodutores.

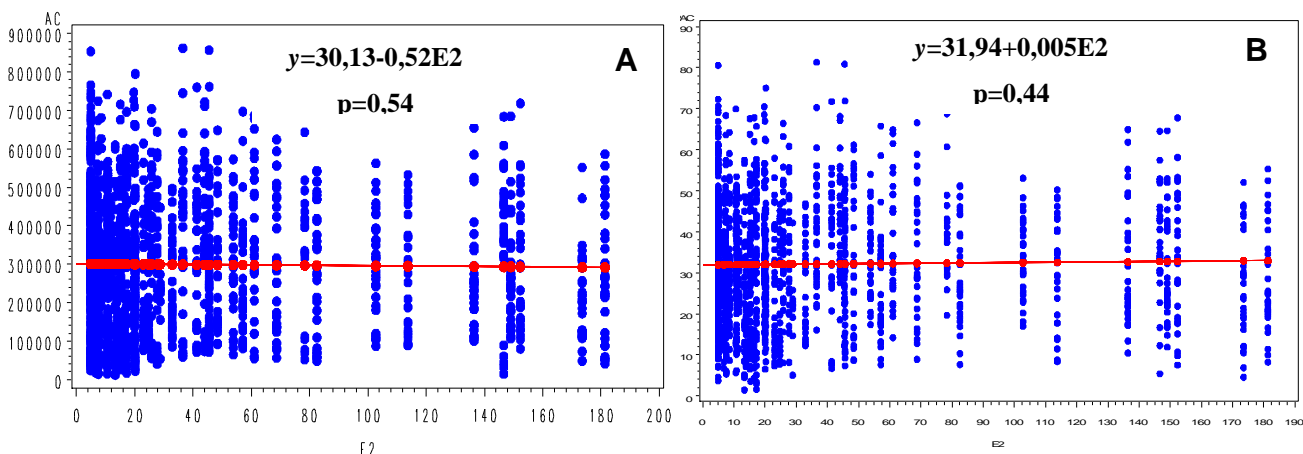


Figura 22. Gráfico da relação linear neutra não significativa ( $p>0,05$ ), na marcação do *CYR61* nos órgãos reprodutores, (A) área com marcação citoplasmática positiva (AC) em relação aos valores de E2 e, (B) porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva (PAC) em relação aos valores de E2.

Como demonstrado na Tabela 6, o ovário apresentou maior área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva do anticorpo anti-CYR61, seguido pelo corno uterino, corpo do útero e tuba uterina. Isso pode ser explicado devido à maior quantidade de células secretoras na região cortical dos ovários, responsáveis pela produção de estrógeno e progesterona pelos folículos ovarianos em desenvolvimento e corpo lúteo ativo, quando comparados às células secretoras do epitélio de revestimento do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, e glândulas endometriais no corno uterino e corpo do útero.

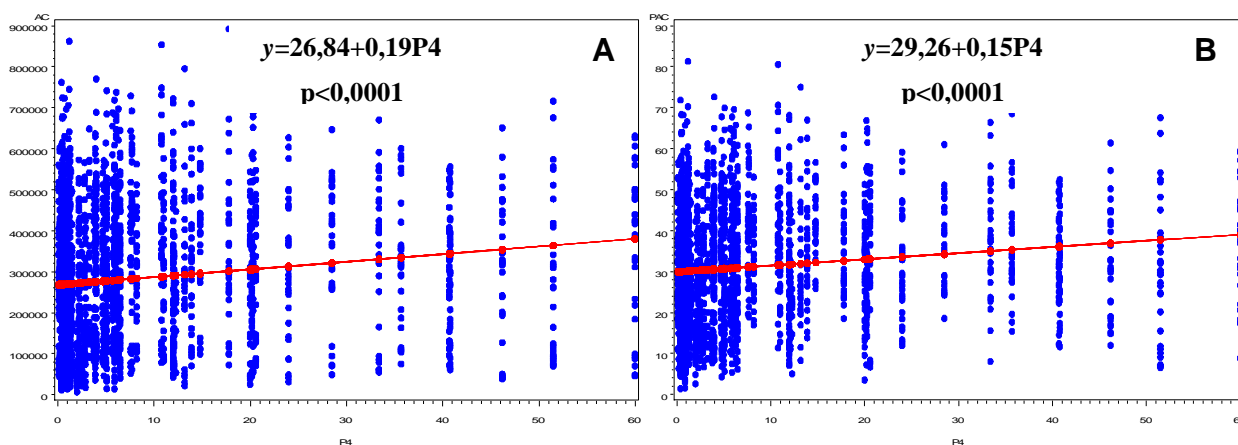


Figura 21. Gráfico da relação linear positiva significativa ( $p\leq 0,05$ ) na marcação do *CYR61* nos órgãos reprodutores, (A) área com marcação citoplasmática positiva (AC) em relação aos valores de P4 e, (B) porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva (PAC) em relação aos valores de P4.

### 5.4.1.1 Corno uterino e corpo do útero

A Tabela 7 demonstra diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) comparando o endométrio mais miométrio (AC e PAC) entre fases, no corno uterino e corpo do útero das fêmeas caninas nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra

Tabela 7. Teste de Tukey para comparação das médias  $\pm$  desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no endométrio mais miométrio do corno uterino e corpo do útero, comparados entre fases e piometra, em ordem de classificação da fase com menor marcação para a fase com maior marcação.

Fase	Corno uterino		Fase	Corpo do útero	
	AC ( $\mu\text{m}^2$ )	PAC (%)		AC ( $\mu\text{m}^2$ )	PAC (%)
<b>Pré-púbere</b>	45135,1 $\pm$ 18928,49 <b>C</b>	17,03 $\pm$ 7,14 <b>C</b>	<b>Pré-púbere</b>	46466,87 $\pm$ 26098,49 <b>C</b>	17,53 $\pm$ 9,85 <b>C</b>
<b>Proestro</b>	296573,15 $\pm$ 169375,24 <b>A</b>	27,97 $\pm$ 15,98 <b>A</b>	<b>Anestro</b>	290918,67 $\pm$ 139536,61 <b>B</b>	27,44 $\pm$ 13,16 <b>B</b>
<b>Anestro</b>	317404,15 $\pm$ 130780,58 <b>A</b>	29,94 $\pm$ 12,34 <b>A</b>	<b>Estro</b>	311034,1 $\pm$ 158366,89 <b>AB</b>	29,34 $\pm$ 14,94 <b>AB</b>
<b>Estro</b>	349333,63 $\pm$ 157687,09 <b>AB</b>	32,95 $\pm$ 14,87 <b>AB</b>	<b>Proestro</b>	316737,3 $\pm$ 170162,3 <b>AB</b>	29,88 $\pm$ 16,05 <b>AB</b>
<b>Diestro</b>	392346,72 $\pm$ 150156,51 <b>BD</b>	37 $\pm$ 14,16 <b>BD</b>	<b>Diestro</b>	355405,74 $\pm$ 140110,15 <b>A</b>	33,52 $\pm$ 13,22 <b>A</b>
<b>Piometra</b>	420618,83 $\pm$ 151495,95 <b>D</b>	39,67 $\pm$ 14,29 <b>D</b>	<b>Piometra</b>	369976,19 $\pm$ 133427,06 <b>A</b>	34,9 $\pm$ 12,59 <b>A</b>

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Para análise morfométrica detalhada da área com marcação positiva nas lâminas de imunistoquímica de corno uterino e corpo do útero, os componentes dos órgãos foram divididos para análise de endométrio e análise de miométrio do corno uterino e corpo do útero.

A Tabela 8 demonstra diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) comparando o endométrio e miométrio do corno e corpo uterino (AENDC, PAENDC, AMIOC e PAMIOC) entre fases, componentes estruturais dos órgãos, e entre fases e componentes estruturais dos órgãos.

Tabela 8. Valores de p para as variáveis do corno uterino e corpo do útero, comparadas entre fases, estruturas e fases x estruturas.

Variáveis analisadas	p Fase	p Estrutura	p Fase x Estrutura
<b>AENDC</b>	<0,0001	0,0012	0,06
<b>PAENDC</b>	<0,0001	0,0002	0,1356
<b>AMIIOC</b>	<0,0001	0,0109	0,0001
<b>PAMIIOC</b>	<0,0001	0,0759	<0,0001

$p \leq 0,05$  diferem significativamente pelo teste de Tukey.

A Tabela 9 demonstra diferença significativa, pelo teste de Tukey com 5% de significância, com relação às análises de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva, no endométrio e miométrio do corno uterino mais corpo do útero (AENDC, PAENDC, AMIIOC e PAMIIOC), comparadas entre fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 9. Teste de Tukey para comparação das médias  $\pm$  desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no endométrio e miométrio do corno uterino e corpo do útero, comparados entre fases e piometra, a 5% de significância, em ordem de classificação da fase com menor marcação para a fase com maior marcação.

Fase	AENDC ( $\mu\text{m}^2$ )	PAENDC (%)	Fase	AMIIOC ( $\mu\text{m}^2$ )	PAMIIOC (%)
<b>Pré-púbere</b>	38470,17 $\pm$ 17250,34 <b>E</b>	14,51 $\pm$ 6,5 <b>E</b>	<b>Pré-púbere</b>	53131,8 $\pm$ 25189,97 <b>C</b>	20,05 $\pm$ 9,5 <b>C</b>
<b>Proestro</b>	185069,50 $\pm$ 122546,94 <b>D</b>	17,46 $\pm$ 11,56 <b>DE</b>	<b>Anestro</b>	368803,78 $\pm$ 121242,33 <b>B</b>	34,79 $\pm$ 11,44 <b>B</b>
<b>Estro</b>	229032,22 $\pm$ 110935,22 <b>CD</b>	21,60 $\pm$ 10,46 <b>CD</b>	<b>Proestro</b>	428240,96 $\pm$ 114170,59 <b>A</b>	40,39 $\pm$ 10,77 <b>A</b>
<b>Anestro</b>	239519,04 $\pm$ 117547,6 <b>C</b>	22,59 $\pm$ 11,09 <b>C</b>	<b>Estro</b>	431335,51 $\pm$ 133359,27 <b>A</b>	40,69 $\pm$ 12,58 <b>A</b>
<b>Diestro</b>	307813,01 $\pm$ 121170,97 <b>B</b>	29,03 $\pm$ 11,43 <b>B</b>	<b>Piometra</b>	434614,42 $\pm$ 144609,69 <b>A</b>	40,99 $\pm$ 13,64 <b>A</b>
<b>Piometra</b>	354279,59 $\pm$ 133339,44 <b>A</b>	33,42 $\pm$ 12,58 <b>A</b>	<b>Diestro</b>	441131,1 $\pm$ 139038,04 <b>A</b>	41,61 $\pm$ 13,11 <b>A</b>

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os gráficos da Figura 23 demonstram a relação linear positiva significativa ( $p \leq 0,05$ ) na fração de área com marcação citoplasmática positiva para o anticorpo anti-CYR61 no endométrio e miométrio do corno uterino e corpo do útero (AENDC, PAENDC, AMIIOC, PAMIIOC), em relação aos valores séricos de progesterona, demonstrando que quanto maior o valor de progesterona sérico encontrado, maior a fração de área com marcação citoplasmática positiva.

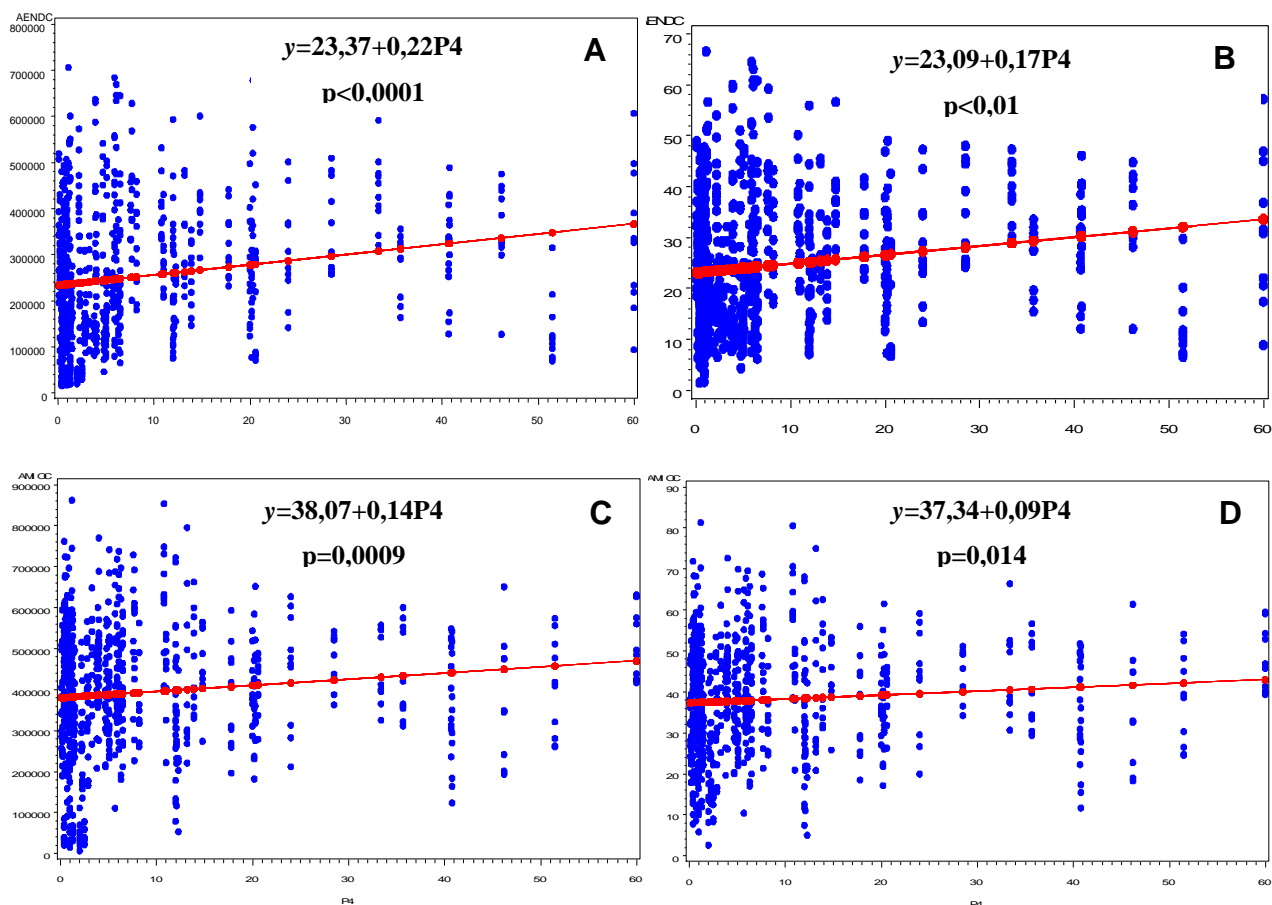


Figura 23. Gráficos da relação linear significativa ( $p\leq 0,05$ ) da área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva e valores séricos de progesterona, (A) área marcada do endométrio (AENDC) em relação à P4, (B) porcentagem de área do endométrio (PAENDC) em relação à P4, (C) área marcada do miométrio (AMIOC) em relação à P4 e, (D) porcentagem de área marcada do miométrio (PA) em relação à P4.

Os gráficos da Figura 24 demonstram a relação linear negativa não significativa ( $p>0,05$ ) na fração de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva para o anticorpo anti-CYR61 no endométrio e miométrio do corno uterino e corpo do útero (AMIOC e PAMIOC), em relação aos valores séricos de estradiol, demonstrando que quanto maior as concentrações plasmáticas desses hormônios, menor a fração de área com marcação citoplasmática positiva nestes componentes estruturais dos órgãos.

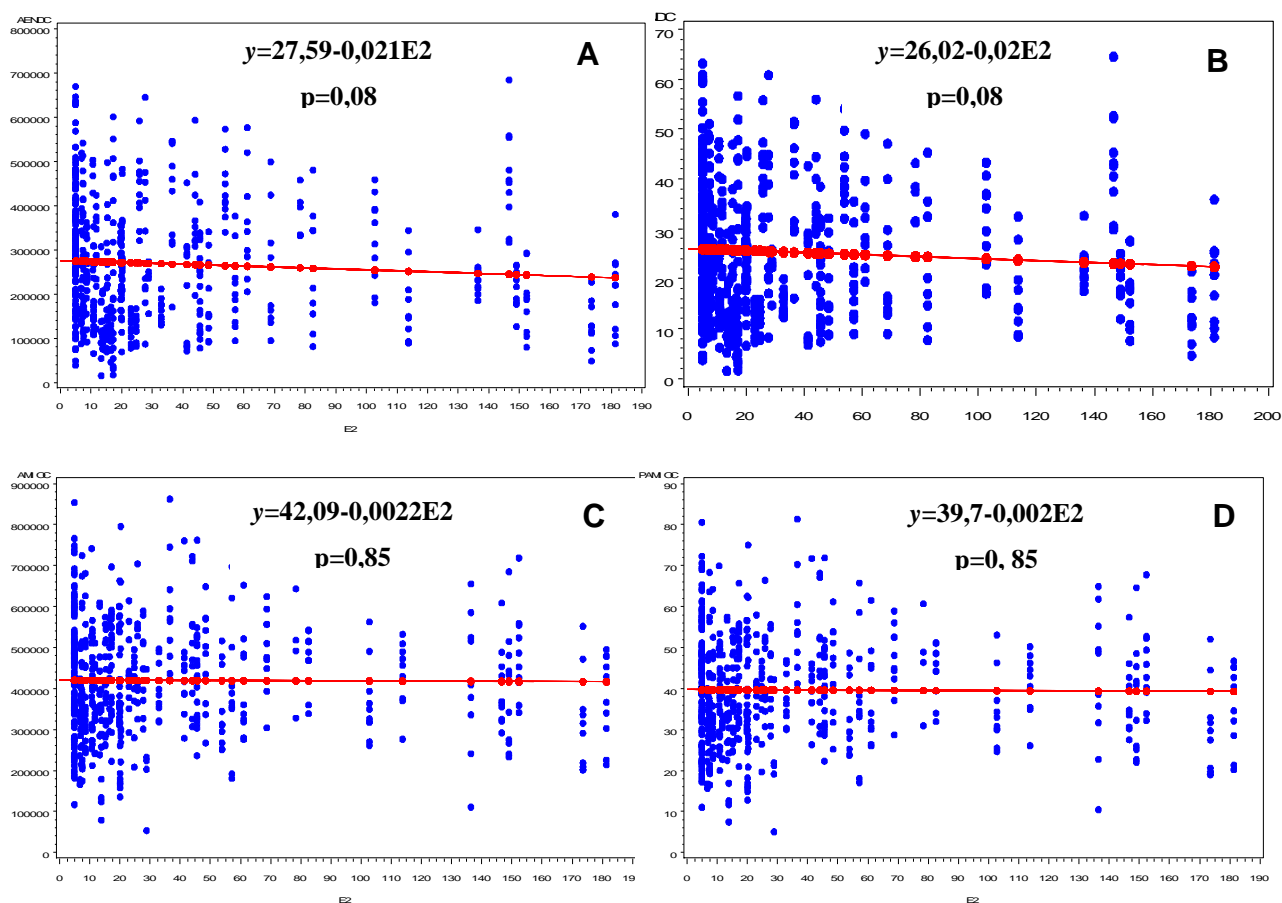


Figura 24. Gráficos da relação linear neutra e negativa não significativa ( $p>0,05$ ) da área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva e valores séricos de estradiol, (A) área marcada do endométrio (AENDC) em relação à E2, (B) porcentagem de área do endométrio (PAENDC) em relação à E2, (C) área marcada do miométrio (AMIOC) em relação à E2 e, (D) porcentagem de área marcada do miométrio (PA) em relação à E2.

Os gráficos da Figura 24 demonstram relação linear neutra (C e D) e negativa (A e B) não significativas ( $p>0,05$ ), na fração de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva para o anticorpo anti-CYR61 no miométrio do corno uterino e corpo do útero (AMIOC e PAMIOC), em relação aos valores séricos de estradiol, demonstrando que as variações neste hormônio nas diferentes fases do ciclo estral e piometra não influenciam a marcação positiva no miométrio do corno uterino e corpo do útero.

A Tabela 10 demonstra diferença significativa, pelo teste de Tukey com 5% de significância, com relação às análises de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva, no endométrio e miométrio do corno uterino e corpo do útero (AENDC, PAENDC, AMIOC e PAMIOC), comparadas entre órgãos.

Tabela 10. Teste de Tukey para comparação das médias±desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no endométrio e miométrio do corno uterino e corpo do útero, a 5% de significância, em ordem de classificação do órgão com menor marcação para o órgão com maior marcação.

Estrutura	AENDC ( $\mu\text{m}^2$ )	PAENDC (%)	AMIOC ( $\mu\text{m}^2$ )	PAMIOC (%)
Corpo do útero	215768,27±136284,36 B	21,77±11,47 B	355678,27±175699,9 B	36,13±13,54 A
Corno uterino	251351,49±159821,02 A	25,6±13,4 A	370955,03±187150,93 A	36,96±14,84 A

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

As Tabelas 11 e 12 demonstram diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05\%$ ) com relação às análises de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva, no endométrio e miométrio do corno uterino e corpo do útero (AENDC, PAENDC, AMIOC e PAMIOC), comparados entre fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 11. Médias±desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasma positiva no endométrio do corno uterino e corpo do útero, comparados nas diferentes fases do ciclo estral e piometra, em ordem de classificação da fase com menor marcação para a fase com maior marcação.

Fase	Corno uterino		Corpo do útero	
	AENDC ( $\mu\text{m}^2$ )	PAENDC (%)	AENDC ( $\mu\text{m}^2$ )	PAENDC (%)
Pré-púbere	44226,16±17953,84 D	16,69±6,77 A	32714,18±14480,02 C	12,34±5,46 A
Proestro	189223,48±145505,01 A	17,85±13,72 A	180915,51±95201,89 A	17,06±8,98 A
Estro	253075,1±117337,35 B	23,87±11,07 AC	204989,35±99147,46 A	19,34±9,35 A
Anestro	268861,57±119359,75 B	25,36±11,26 C	210176,52±108716,45 A	19,83±10,25 A
Diestro	335056,97±138893,03 C	31,6±13,1 B	278752,78±91116,46 B	26,29±8,6 B
Piometra	373557,87±138665,6 C	35,24±13,08 B	335001,31±125573,07 B	31,6±11,84 B

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 12. Médias±desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação positiva em citoplasma no miométrio do corno uterino e corpo do útero, comparados nas diferentes fases do ciclo estral e piometra, e nas duas estruturas, em ordem de classificação da fase com menor marcação para a fase com maior marcação.

Fase	Corno uterino		Corpo do útero	
	AMIOC ( $\mu\text{m}^2$ )	PAMIOC (%)	AMIOC ( $\mu\text{m}^2$ )	PAMIOC (%)
<b>Pré-púbere</b>	46044,04±19934,94 <b>C</b>	17,37±7,52 <b>C</b>	60219,57±27900,02 <b>C</b>	22,72±10,53 <b>CD</b>
<b>Proestro</b>	403922,82±115084,56 <b>AB</b>	38,1±10,86 <b>AB</b>	452559,09±108755,87 <b>A</b>	42,69±10,26 <b>AE</b>
<b>Anestro</b>	365946,74±124114,67 <b>B</b>	34,52±11,71 <b>B</b>	371660,82±119014,67 <b>BD</b>	35,06±11,23 <b>BDE</b>
<b>Estro</b>	445592,16±132329,68 <b>A</b>	42,03±12,48 <b>A</b>	417078,85±133685,15 <b>AB</b>	39,34±12,6 <b>ABE</b>
<b>Diestro</b>	449636,48±139430,13 <b>A</b>	42,41±13,15 <b>A</b>	432058,71±138977,07 <b>AB</b>	40,75±13,11 <b>ABE</b>
<b>Piometra</b>	467679,78±149804,76 <b>A</b>	44,11±14,13 <b>A</b>	403202,33±132759,58 <b>ABD</b>	38,03±12,52 <b>E</b>

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A Figura 25 corresponde à marcação citoplasmática positiva no epitélio de revestimento, fibroblastos da lâmina própria, glândulas endometriais no endométrio do corno uterino, fibras musculares lisas do miométrio circular e miométrio longitudinal e fibras musculares lisas das artérias, em fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.



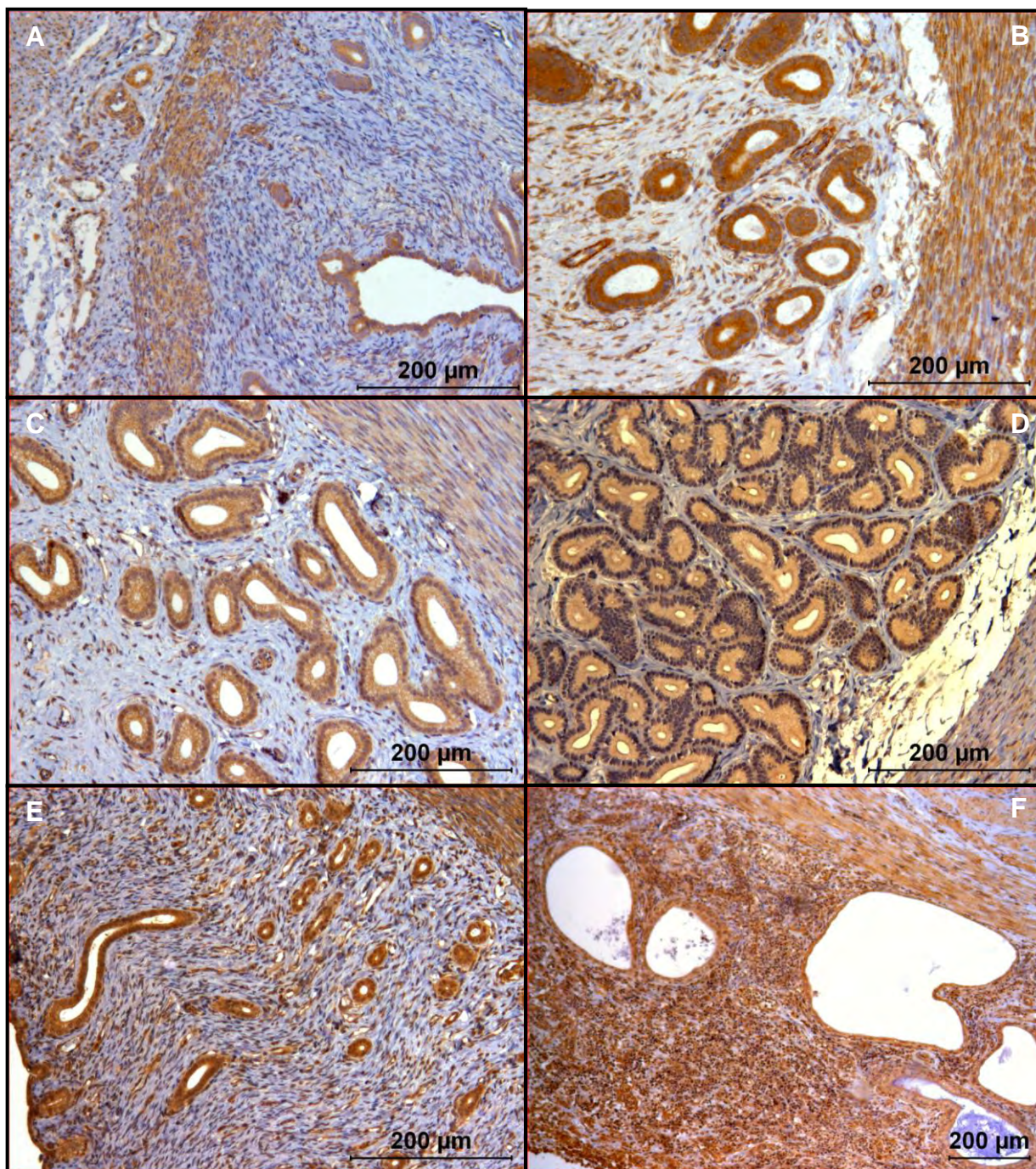


Figura 25. Marcação citoplasmática positiva da proteína *CYR61* nos componentes epiteliais e estromais do corno uterino das fêmeas caninas, 10x e 20x. (A) fêmeas pré-púberes, 20x, (B) fêmeas na fase de próestro, 20x, (C) fêmeas na fase de estro, 20x, (D) fêmeas na fase de diestro, 20x, (E) fêmeas na fase de anestro, 20x, (F) fêmeas acometidas por piometra, 10x.

A Figura 26 corresponde à marcação citoplasmática positiva no epitélio de revestimento, fibroblastos da lâmina própria, glândulas endometriais no endométrio do corpo do útero, fibras musculares lisas do miométrio circular e miométrio longitudinal e fibras musculares lisas das artérias, em fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

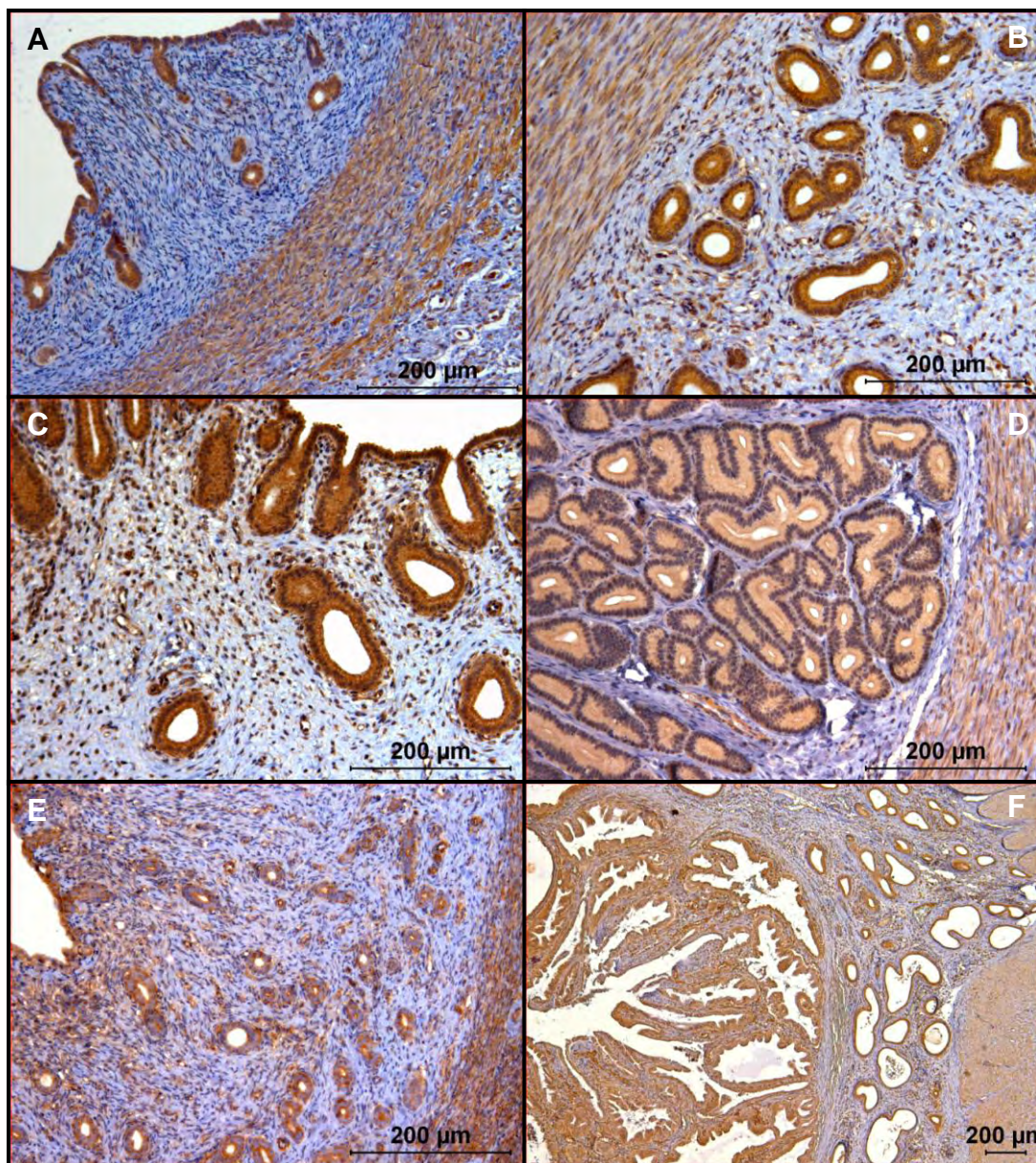


Figura 26. Marcação citoplasmática positiva da proteína *CYR61* nos componentes epiteliais e estromais do corpo do útero das fêmeas caninas, 5x e 20x. (A) fêmeas pré-púberes, 20x, (B) fêmeas na fase de próestro, 20x, (C) fêmeas na fase de estro, 20x, (D) fêmeas na fase de diestro, 20x, (E) fêmeas na fase de anestro, 20x, (F) fêmeas acometidas por piometra, 5x.

Com relação aos resultados de marcação citoplasmática positiva no corno uterino e corpo do útero, as fêmeas pré-púberes apresentaram menor área e porcentagem de área marcada no endométrio e miométrio do corno uterino e corpo do útero, que pode ser explicado devido às baixas concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona,  $5\text{pg/mL}$  e  $1,44\pm 0,74\text{ng/mL}$  respectivamente, encontradas nessas fêmeas, devido à quiescência ovariana, resultante da imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, responsável por características como pequena quantidade de glândulas endometriais, pouco desenvolvidas, epitélio de revestimento pouco desenvolvido no corno uterino, corpo do útero e tuba uterina e miométrio com fibras musculares lisas estreitas, entremeadas por grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo (marcação negativa de CYR61).

As fêmeas acometidas por piometra apresentaram maior área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no endométrio do corno uterino e corpo do útero, que pode ser explicada devido às altas concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona,  $31,9\pm 41,8\text{pg/mL}$  e  $13,76\pm 15,17\text{ng/mL}$  encontradas nesta fase, além de alterações no corno uterino e corpo do útero como epitélio de revestimento e glândulas endometriais muito desenvolvidas, hiperplásicas e hipertrofiadas e grande quantidade de fibroblastos na lâmina própria. Essas características secretórias e proliferativas no endométrio das fêmeas acometidas por piometra, provocadas pelos efeitos acumulativos de progesterona e estradiol nesses tecidos, resultam em correlação positiva com alta expressão do CYR61.

Com relação ao miométrio, as fêmeas na fase de diestro apresentaram maior fração de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva quando comparadas às fêmeas acometidas por piometra, que pode ser explicada devido às fêmeas doentes apresentarem miométrio com fibras musculares lisas estreitas entremeadas por maior quantidade de tecido conjuntivo frouxo, resultante da distensão exagerada por acúmulo de fluido mucopurulento no lúmen do órgão. As fêmeas na fase de diestro apresentaram hiperplasia e

proliferação acentuada do miométrio, decorrente da secreção elevada de estrógeno por células da granulosa secretoras de esteróides entre os fibroblastos da teca interna dos folículos, durante o desenvolvimento folicular, que se inicia na fase de proestro e continua na fase lútea, sendo produzida pelo corpo lúteo juntamente com a progesterona, e potencialização dos efeitos do estrógeno nos tecidos uterinos, pela progesterona na fase lútea do ciclo estral.

O endométrio normal sofre alterações estruturais importantes, combinado com alterações nas funções específicas das células, em resposta às variações cíclicas de estrógeno e progesterona durante o ciclo menstrual da mulher (ABSENGER et al., 2004) e ciclo estral das fêmeas caninas. Em mulheres, os estrógenos atuam no endométrio induzindo proliferação celular, e a fase proliferativa é influenciada pela progesterona secretada pelo corpo lúteo, que continua estimulando as células glandulares endometriais que se desenvolveram pela ação do estrógeno.

Na fase de diestro, sob ação da progesterona, o endométrio e miométrio alcançam máxima espessura resultante do desenvolvimento epitelial, acúmulo de secreção e do edema no estroma (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Fêmeas na fase de proestro, que apresentaram valores baixos de progesterona e valores altos de estradiol,  $1,95 \pm 1,58 \text{ ng/mL}$  e  $49,71 \pm 47,05 \text{ pg/mL}$  respectivamente, fêmeas na fase de estro, que apresentam valores baixos de progesterona e valores altos de estradiol,  $5,3 \pm 1,03 \text{ ng/mL}$  e  $77,07 \pm 57,58 \text{ pg/mL}$  respectivamente, e fêmeas na fase de anestro, que apresentam valores baixos de progesterona e valores altos de estradiol,  $1,06 \pm 0,79 \text{ ng/mL}$  e  $27,14 \pm 48,40 \text{ pg/mL}$  respectivamente, apresentaram, após as fêmeas pré-púberes, menor área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no endométrio e miométrio do corno uterino. A fase de proestro que apresenta os menores valores de progesterona e estradiol resultou, após as fêmeas pré-púberes, em menor área e porcentagem de área marcada. As fêmeas na fase de estro, que apresentam valores de progesterona e estradiol superiores às fêmeas na fase de anestro, resultaram em maior área e porcentagem de área com marcação

citoplasmática positiva no endométrio mais miométrio quando comparadas à fase de anestro. Mas as fêmeas em anestro, que apresentaram concentrações plasmáticas de estradiol superiores às fêmeas em proestro, resultaram em maior área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no endométrio e miométrio quando comparadas às fêmeas na fase de proestro.

Com esses resultados é possível concluir que a expressão do CYR61 no tecido endometrial e miometrial do corno uterino e corpo do útero está mais relacionada com concentrações plasmáticas de progesterona do que com as concentrações plasmáticas de estradiol. No entanto, a menor expressão do CYR61 no útero de fêmeas em anestro quando comparadas às fêmeas de estro, sugerem regulação positiva do estrógeno, mas o fato das fêmeas na fase de diestro apresentarem valores de estradiol inferiores às fêmeas em estro, mas maior expressão do CYR61 nos tecidos endometriais e miometriais, sugere que a expressão do CYR61 no útero das fêmeas caninas é regulada por estrógeno e potencializada pela progesterona.

Os resultados deste experimento confirmam os resultados de LUNDEEN et al. (2000), TAYLOR et al. (2002) e ABSENGER et al. (2004), que demonstraram diferenças na regulação de vários genes em endométrio ectópico comparado a endométrio normal de mulheres, identificados principalmente na fase secretora e proliferativa, sob controle do estrógeno e progesterona, como o receptor órfão de TR3 (UEMURA et al., 1995), EGR-1 (PRATT et al., 1998), c-fos (DUAN et al., 2002) e jun-B (CICATIELLO et al., 1992). Entre os genes responsivos ao estrógeno, o CYR61 demonstra regulação positiva significativa no endométrio de mulheres com endometriose, durante a fase secretora e proliferativa (ABSENGER et al., 2004). A alta expressão do CYR61 demonstra influencia no desenvolvimento e sobrevivência do endométrio ectópico, e foi demonstrado em mulheres (LUNDEEN et al., 2000; TAYLOR et al., 2002; ABSENGER et al., 2004), ratas adultas (RIVERA-GONZALEZ et al., 1998) e fêmeas de babuíno (*Papio anubis*) (GASHAW et al., 2006). A piometra nas fêmeas caninas e endometriose em mulheres são caracterizadas por proliferação e desenvolvimento endometrial,

mas na endometriose, tal crescimento anormal ocorre em sítios ectópicos, e nas fêmeas caninas acometidas por piometra, ocorre no lúmen uterino.

GASHAW et al. (2006) afirma que a alta expressão de CYR61 no endométrio de fêmeas de babuíno foi identificada na fase secretora do endométrio, e não na fase proliferativa. Os resultados deste experimento confirmam os resultados de GASHAW et al. (2006), visto que a área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no corno uterino e corpo do útero, foram maiores na fase secretora quando comparadas à fase proliferativa. Isto pode ser explicado devido aos efeitos da fase proliferativa induzidos por concentrações plasmáticas elevadas de estrógeno nas fases de proestro e estro do ciclo estral, serem potencializados por ação da progesterona, na fase secretora, diestro, nas fêmeas caninas, somando os efeitos e culminando com maiores alterações na morfologia do órgão quando comparada a fase proliferativa de proestro. Elevação das concentrações de estrógenos na fase proliferativa do ciclo estral é responsável por elevação da sensibilidade dos receptores uterinos à progesterona, edema, aumento da vascularização e proliferação endometrial, resultando em hiperplasia do endométrio com o surgimento de criptas. Tais alterações associadas às altas concentrações de progesterona sérica no final do estro e fase de diestro, que estimulam proliferação glandular e aumentam atividade secretória das glândulas endometriais, favorecem ainda mais as modificações estruturais do útero (HARDY & OSBORNE, 1974; JOHNSTON et al., 2001; FIENI, 2006).

MACLAUGHLAN et al. (2007) afirmam que o endométrio normal apresenta maior expressão de CYR61 na fase proliferativa quando comparadas à fase secretória basal. Visto que os níveis séricos de estrógenos são iguais em mulheres saudáveis e acometidas por endometriose, acredita-se que ocorra uma inadequada resposta do endométrio ao estrógeno, resultando em fase proliferativa prolongada anormal. Níveis elevados de CYR61 foram encontrados no endométrio de pacientes com síndrome dos ovários policísticos, hiperplasia endometrial e adenocarcinoma, demonstrando que a proteína apresenta elevada capacidade de

resposta ao estrógeno, atuando como biomarcador precoce para o desenvolvimento dessas afecções (MACLAUGHLAN et al., 2007).

As diferenças encontradas na alta expressão do CYR61 na fase proliferativa e secretória da mulher e principalmente na fase secretória das fêmeas de babuíno (GASHAW et al., 2006) e fêmeas caninas encontradas neste experimento podem ser explicadas pelas diferenças nas características do ciclo menstrual da mulher e ciclo estral da fêmea canina. A fase proliferativa é considerada como fase pré-ovulatória na mulher, caracterizada por desenvolvimento folicular e concentrações plasmáticas pouco elevadas de estradiol e reduzidas de progesterona, que resultam em degeneração e descolamento do endométrio. As alterações endometriais durante esta fase são mais intensas quando comparadas à fase folicular da fêmea canina. Na fêmea canina a fase lútea, marcada pelo estro e diestro, representa a fase de maiores alterações no endométrio e miométrio do corno uterino e corpo do útero da fêmea canina, apresentando proliferação, hiperplasia, hipertrofia e aumento na atividade secretória das glândulas endometriais e epitélio de revestimento do endométrio, iniciadas na fase de proestro e potencializadas na fase de estro e diestro pela ação da progesterona, enfatizando que a expressão do CYR61 se correlaciona com as alterações morfológicas e funcionais dos órgãos reprodutores, assim como com as concentrações séricas de progesterona e estradiol.

A maior expressão do CYR61 no endométrio de fêmeas caninas acometidas por piometra quando comparadas às fêmeas na fase de diestro indica que outros mediadores estão envolvidos na regulação do CYR61 neste tecido, além do estrógeno e progesterona, visto que as concentrações hormonais nas fêmeas acometidas por piometra são normais, semelhantes às concentrações na fase de diestro, demonstrando que a afecção, resultante da irregularidade nos receptores endometriais de estrógeno e progesterona (SCHOON et al., 1992; FALDYNA et al., 2001; STONE, 2003; ROOT KUSTRITZ, 2005) apresenta outros mediadores importantes na regulação do CYR61.

Níveis altos de CYR61 são encontrados no endométrio na fase menstrual da mulher e das fêmeas de babuíno (GASHAW et al., 2006), correspondendo aos padrões de expressão de outros fatores angiogênicos, como o VEGF e receptor de VEGF, que também é identificado como estrógeno dependente no tecido uterino (BAUSERO et al., 1998). SHARKEY et al. (2000) acreditam que o CYR61 pertença à família de genes induzidos por estresse oxidativo no endométrio, como o VEGF. MATSUZAKI et al. (1998), MATSUZAKI et al. (2001), TAN et al. (2002) e GASHAW et al. (2006), demonstraram diferença no padrão da expressão do CYR61 em endométrios ectópicos, com maior expressão nas regiões mais vascularizadas, com vasos sanguíneos imaturos e que apresentam alta expressão de VEGF, demonstrando correlação positiva entre CYR61 e VEGF, indicando regulação comum entre ambos os fatores próangiogênicos e influência diretamente proporcional no desenvolvimento de endométrios ectópicos. GASHAW et al. (2006) afirmam que a alta expressão em lesões excessivamente vascularizadas ocorre devido ao aumento no número de células endoteliais que expressam o CYR61. Durante a fase de proestro e estro ocorre um aumento da vascularização e turgidez do trato genital da fêmea canina (HEDLUND, 2002; HOWE, 2006), sob influência do estrógeno, que permanece na fase de diestro e é potencializada nas fêmeas acometidas por piometra, devido à formação de vasos e aumento no afluxo sanguíneo no útero enfermo (NASCIMENTO & SANTOS, 2003).

Estudos demonstram que o fator-1 $\alpha$  induzido por hipóxia (HIF1 $\alpha$ ) interage com jun-B, contribuindo para a regulação do CYR61 nas células sob hipóxia, de melanoma humano (KUNZ et al., 2003), em adição, o fator de transcrição HIF1 $\alpha$  apresentou alta expressão em endométrio menstrual de mulheres (CRITCHELEY et al., 2006), demonstrando que o aumento no estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento da endometriose (JACKSON et al., 2005). Com estes resultados, é possível afirmar que o CYR61 funciona como gene alvo associado à hipóxia para promover angiogênese em tecido endometrial menstrual, que apresenta alta expressão deste gene e de outros fatores angiogênicos, resultado em formação



exagerada de capilares em sítios proliferativos ectópicos (FAZLEABAS et al., 2002; FAZLEABAS et al., 2003).

É conhecido que em situações graves de sepse e isquemia, como na piometra, ocorre incremento exagerado na produção de radicais livres de oxigênio, resultando em situações de estresse oxidativo (COLS, 2001), justificando maior expressão do CYR61 nestas fêmeas caninas doentes.

GASHAW et al. (2006) afirmam que outros genes estrógeno-dependentes, como o FOS (cfos) são altamente regulados na endometriose, sugerindo que o endométrio na fase secretória responde inadequadamente à progesterona, em mulheres e fêmeas de babuíno. FAZLEABAS et al. (2002) sugerem que a alta expressão de aromatase ou desequilíbrio na 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase 1 e 2 (ZEITOUN et al., 1998; ABSENGER et al., 2004) pode contribuir para a regulação positiva dos genes dependentes de estrógeno na fase secretora, mas GASHAW et al. (2006) demonstraram aumento significativo de CYR61 entre 1 e 3 meses após o estabelecimento da doença, tempo insuficiente para a detecção da aromatase (FAZLEABAS et al., 2003). O mecanismo parácrino que direciona a elevação de CYR61 no endométrio continua a ser explorado. Vários outros mediadores têm sido estudados na regulação da expressão de CYR61, como citocinas inflamatórias, tais como interleucinas, particularmente IL6, IL10 (BEDAIWY & FALCONE, 2003; TABIBZADEH et al., 2003) e as interleucinas IL1B, IL2 e IL6 são conhecidas como indutores na expressão de CYR61 *in vitro* (SCHUTZE et al., 1998). Sabe-se que o processo inflamatório instalado no útero é responsável pela liberação de interleucinas (IL1 e IL6) e fator de necrose tumoral (TNF) (ANDREWS et al., 1994). A piometra resulta em síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (NELSON & COUTO, 1998). A SIRS é mediada pela produção inicial de citocinas e estimulação na produção do fator de crescimento (PURVIS & KIRBY, 1994). Sugere-se que esses mediadores inflamatórios influenciam a regulação do CYR61 na piometra em fêmeas caninas.

RACHFAL & BRIGSTOCK (2005) afirmam que a função de fatores próangiogênicos como o CYR61 é mediada por integrinas, como ITGAV, ITGA6,

ITGB1 e ITGB3, que demonstraram importante papel na regulação da CYR61 em adesões celulares e angiogênese. Essas integrinas são encontradas em baixa expressão em tecidos endometriais e alta expressão em tecidos ectópicos de endometriose (van der LINDEN et al., 1995; HII & ROGERS, 1998; CREUS et al., 2002). Os polimorfonucleares mobilizados pela piometra expressam moléculas de adesão na membrana celular (integrina e L-selectina) (MACKAY, 2000), sugere-se que as integrinas expressas na piometra regulam a expressão do CYR61 no útero das fêmeas caninas.

Os mecanismos exatos pelos quais o CYR61 media a patogênese do crescimento e proliferação endometrial não foram completamente elucidados, mas é evidente que ocorre regulação positiva no endométrio de cães, de babuínos segundo GASHAW et al. (2006), e humanos, implicando em mecanismo de *feedback* positivo nas alterações iniciais do endométrio, como em fêmeas na fase de diestro, alterando sua função e mantendo o endométrio secretor em um estado estrogênico. Sugere-se que citocinas, interleucinas, estresse oxidativo induzido por fator-1 $\alpha$  induzido por hipóxia, VEGF, integrina e outros mediadores estão relacionados com a alta expressão do CYR61 no útero de fêmeas caninas acometidas por piometra.

#### 5.4.1.2 Tuba uterina

As Tabelas 13 e 14 demonstram diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), nos endométrio e miométrio da tuba uterina, comparados entre fases.

Tabela 13. Valores de p para as variáveis AC e PAC da tuba uterina comparadas entre fases.

Variáveis analisadas	p Fase
AC	<0,0001
PAC	<0,0001

$p \leq 0,05$  diferem significativamente pelo teste de Tukey.

Tabela 14. Teste de Tukey para comparação das médias±desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva em endométrio e miométrio da tuba uterina, comparada nas diferentes fases do ciclo estral e piometra, a 5% de significância, em ordem de classificação da fase com menor marcação para a fase com maior marcação.

<b>Fase</b>	<b>AC (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>PAC (%)</b>
<b>Anestro</b>	58214,34±23424,7 <b>C</b>	21,96±8,84 <b>C</b>
<b>Piometra</b>	66814,95±25633,31 <b>C</b>	25,21±9,67 <b>C</b>
<b>Pré-púbere</b>	71942,57±26036,45 <b>C</b>	27,14±9,82 <b>C</b>
<b>Diestro</b>	93701,90±25443,34 <b>B</b>	35,35±9,6 <b>B</b>
<b>Proestro</b>	95689,88±27331,43 <b>B</b>	36,10±10,31 <b>B</b>
<b>Estro</b>	118692,58±26019,87 <b>A</b>	44,78±9,82 <b>A</b>

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O gráfico da Figura 27 demonstra a relação linear positiva na fração de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva para o anticorpo anti-CYR61 no endométrio e miométrio da tuba uterina, em relação aos valores séricos de progesterona (não significativo,  $p > 0,05$ ) e estradiol (significativo,  $p \leq 0,05$ ), demonstrando que quanto maior as concentrações plasmáticas destes hormônios, maior a fração de área com marcação positiva na tuba uterina.

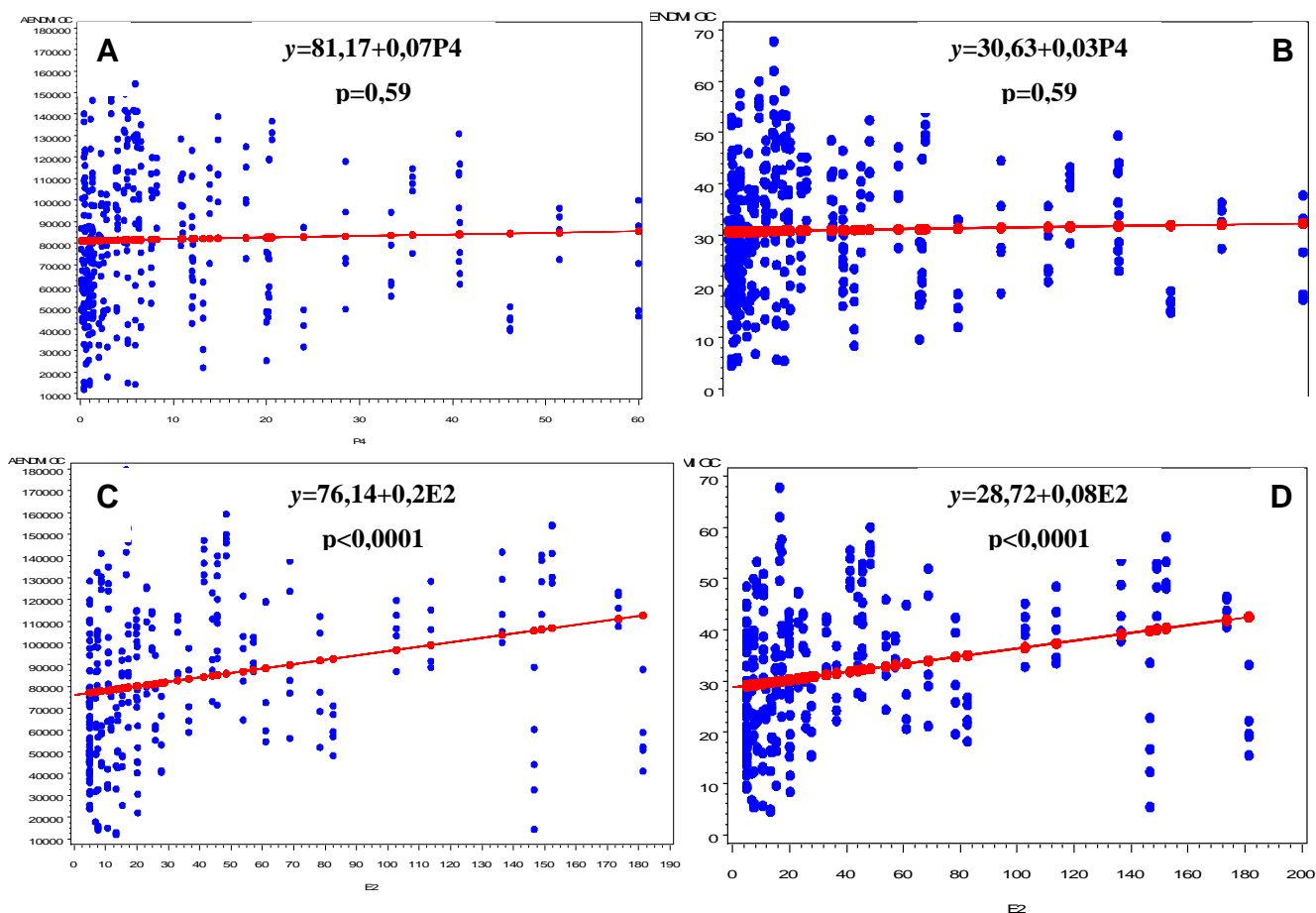


Figura 27. Gráfico da relação linear positiva significativa para os valores de estradiol e não significativa para os valores de P4, da área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no endométrio e miométrio da tuba uterina, com os valores séricos de progesterona e estradiol, (A) área marcada (AC) em relação à P4, (B) porcentagem de área (PAC) em relação à P4, (C) área marcada (AC) em relação à E2 e, (D) porcentagem de área marcada (PA) em relação à E2.

Somente a tuba uterina apresentou correlação linear positiva entre a área e porcentagem de área de marcação citoplasmática do CYR61, em tecidos endometriais e miometriais, quando comparadas aos valores séricos de estradiol, que pode ser explicado pelas funções da tuba uterina, que estão intimamente relacionadas à fase ovulatória e pós-ovulatória imediata, como captura dos óvulos liberados e condução dos mesmos ao útero, transporte de espermatozóides, e

permitir a fertilização em seu interior. As tubas uterinas nestas fases apresentaram características secretórias superiores quando comparadas às fêmeas em diestro.

É possível concluir que a expressão do CYR61 está diretamente relacionada com as alterações morfológicas e funcionais dos órgãos reprodutores femininos, provocadas pelos hormônios ovarianos nas diferentes fases do ciclo estral, de forma particular sobre cada tecido, de acordo com suas funções fisiológicas. O útero das fêmeas caninas apresentou maior área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva de CYR61, na fase lútea do ciclo estral, caracterizada por significativo desenvolvimento secretório e proliferativo endometrial e miometrial, influenciado pela secreção na fase folicular de estrógeno pelos folículos ovarianos e potencialização e somatória dos efeitos do estrógeno associados com alta produção de progesterona pelas células luteínicas do corpo lúteo, nos tecidos, nesta fase. O tecido endometrial e miometrial da tuba uterina das fêmeas caninas apresentaram maior expressão do CYR61 na fase proliferativa do ciclo estral, regulada positivamente de forma significativa pelo estradiol, que pode ser explicada devido às características morfológicas e funcionais desenvolvidas por este órgão na fase ovulatória das fêmeas caninas. Útero de mulheres apresenta alta expressão de CYR61 na fase proliferativa do ciclo menstrual, caracterizada por desenvolvimento, proliferação e descamação de componentes endometriais mais significativos na fase pré-ovulatória, do que na fase lútea do ciclo menstrual.

A Figura 28 demonstra marcação citoplasmática positiva no epitélio de revestimento, fibroblastos da lâmina própria do endométrio e musculatura lisa do miométrio da tuba uterina.

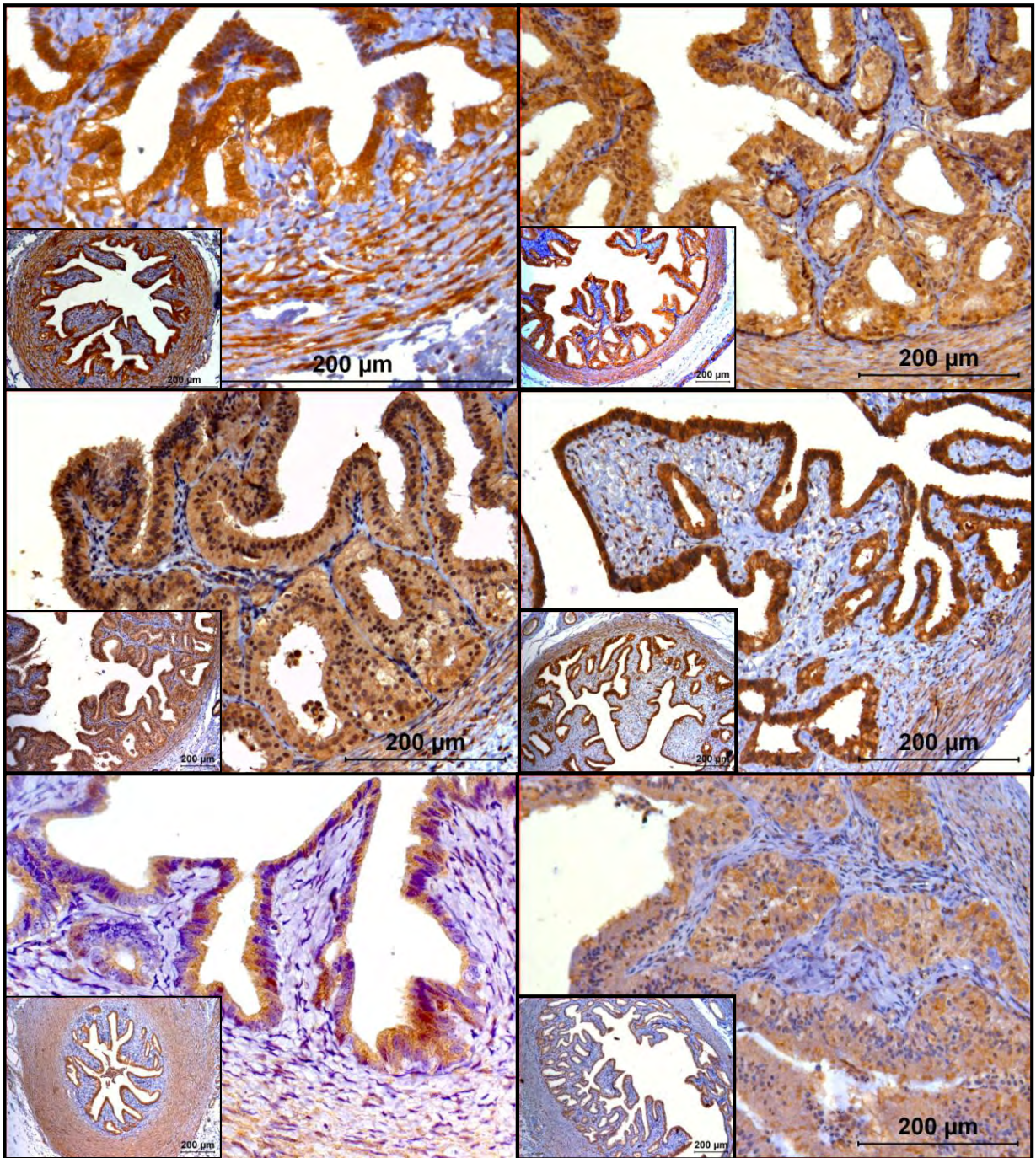


Figura 28. Marcação citoplasmática positiva da proteína *CYR61* nos componentes epiteliais e estromais da tuba uterina das fêmeas caninas, 10x, 20x e 40x. (A) fêmeas pré-púberes, 10x e 40x, (B) fêmeas na fase de próestro, 20x e 40x, (C) fêmeas na fase de estro, 20x e 40x, (D) fêmeas na fase de diestro, 20x e 40x, (E) fêmeas na fase de anestro, 20x e 40x, (F) fêmeas acometidas por piometra, 10x e 40x.

Os resultados demonstram maior área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no endométrio e miométrio da tuba uterina de fêmeas na fase de estro, seguidas das fêmeas na fase de proestro, que pode ser explicada pelas características funcionais do órgão, que compreendem captura dos óvulos liberados, condução dos óvulos ao útero, transporte de espermatozóides e fertilização em seu interior (DYCE et al., 2004), necessitando de maior atividade secretora pelo epitélio de revestimento da tuba uterina após a ovulação, na fase de estro da fêmea canina.

As fêmeas na fase de anestro e pré-púberes não diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5% de significância, que pode ser explicada pela inatividade na função secretória do órgão nestas fases. As fêmeas acometidas por piometra resultaram em menor área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva quando comparadas às fêmeas em diestro, que pode ser explicada pela atividade secretora elevada do epitélio de revestimento do órgão, no início da fase de diestro, e as fêmeas caninas acometidas por piometra são diagnosticadas no final da fase de diestro e início da fase de anestro.

É possível fazer correlação positiva na expressão do CYR61 na tuba uterina de fêmeas caninas com concentrações plasmáticas de progesterona e principalmente de estradiol (Figura 27). As fêmeas na fase de estro e proestro que apresentaram concentrações plasmáticas elevadas de estradiol apresentaram maior expressão do CYR61 no endométrio e miométrio da tuba uterina, quando comparadas às fêmeas em anestro e pré-púberes.

Não foram encontrados estudos sobre a expressão do CYR61 na tuba uterina de outras espécies, mas o mecanismo de ação que regula a expressão é semelhante ao mecanismo supracitado no corno uterino e corpo do útero das fêmeas caninas.

### 5.4.1.3 Ovário

As Tabelas 15 e 16 demonstram diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), na análise do córtex ovariano, comparados entre fases.

Tabela 15. Valores de p para as variáveis do ovário comparadas entre fases.

Variáveis analisadas	p Fase
AC	<0,0001
PAC	<0,0001

$p \leq 0,05$  diferem significativamente pelo teste de Tukey.

Tabela 16. Teste de Tukey para comparação das médias  $\pm$  desvio padrão dos valores de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no córtex ovariano, comparados entre fases e piometra, a 5% de significância, em ordem de classificação da fase com menor marcação para a fase com maior marcação.

Fase	AC ( $\mu\text{m}^2$ )	PAC (%)
Pré-púbere	228906,4 $\pm$ 87379,48 <b>C</b>	21,59 $\pm$ 8,24 <b>C</b>
Estro	285415,71 $\pm$ 96121,42 <b>BC</b>	26,92 $\pm$ 9,07 <b>BC</b>
Proestro	289499,92 $\pm$ 97476,75 <b>BC</b>	27,31 $\pm$ 9,20 <b>BC</b>
Anestro	316766,64 $\pm$ 126851,74 <b>B</b>	29,88 $\pm$ 11,97 <b>B</b>
Piometra	333170,71 $\pm$ 121253,51 <b>B</b>	31,43 $\pm$ 11,44 <b>B</b>
Diestro	432854,31 $\pm$ 169572,70 <b>A</b>	40,83 $\pm$ 16 <b>A</b>

Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O gráfico da Figura 29 demonstra relação linear positiva na fração de área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva para o anticorpo anti-CYR61 no córtex ovariano em relação aos valores séricos de progesterona (significativo,  $p \leq 0,05$ ) e estradiol (não significativo,  $p < 0,05$ ), demonstrando que quanto maior as concentrações plasmáticas desses hormônios, maior a fração de área com marcação positiva no citoplasma das células dos folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, corpo lúteo ativo, corpo lúteo em regressão, *corpo albicans*, glândulas intersticiais e fibroblastos do estroma ovariano.



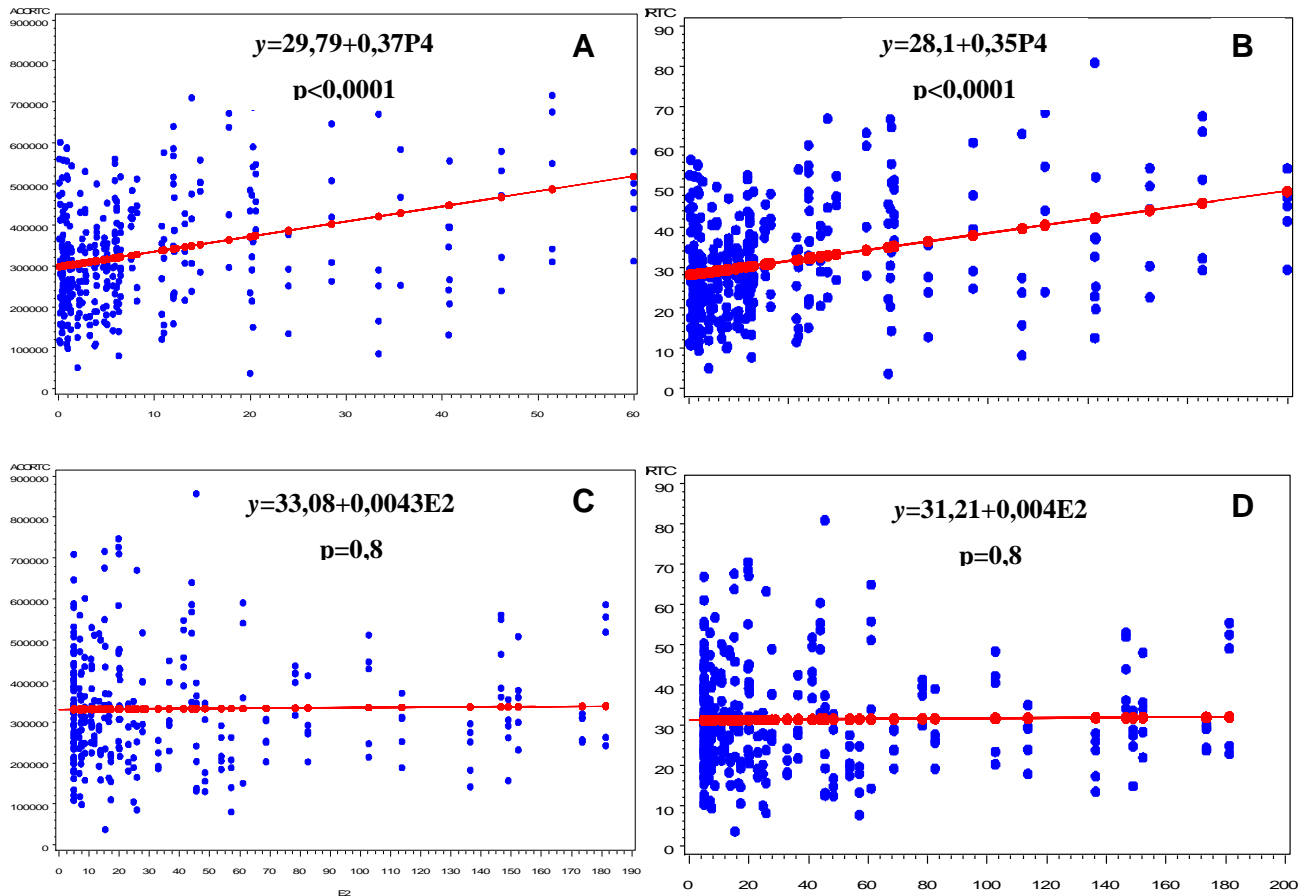


Figura 29. Gráfico da relação linear positiva significativa para os valores de progesterona ( $p \leq 0,05$ ) e não significativa para os valores de estradiol ( $p > 0,05$ ) da área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva no córtex ovariano, com os valores séricos de progesterona e estradiol, (A) área marcada (AC) em relação à P4, (B) porcentagem de área (PAC) em relação à P4, (C) área marcada (AC) em relação à E2 e, (D) porcentagem de área marcada (PA) em relação à E2.

A Figura 30 demonstra marcação citoplasmática positiva no epitélio cúbico simples (epitélio germinativo), fibroblastos do estroma, folículos ovarianos nos diferentes estágios de desenvolvimento, glândulas intersticiais, corpo lúteo, corpo em degeneração e corpo *albicans* e musculatura lisa das artérias.

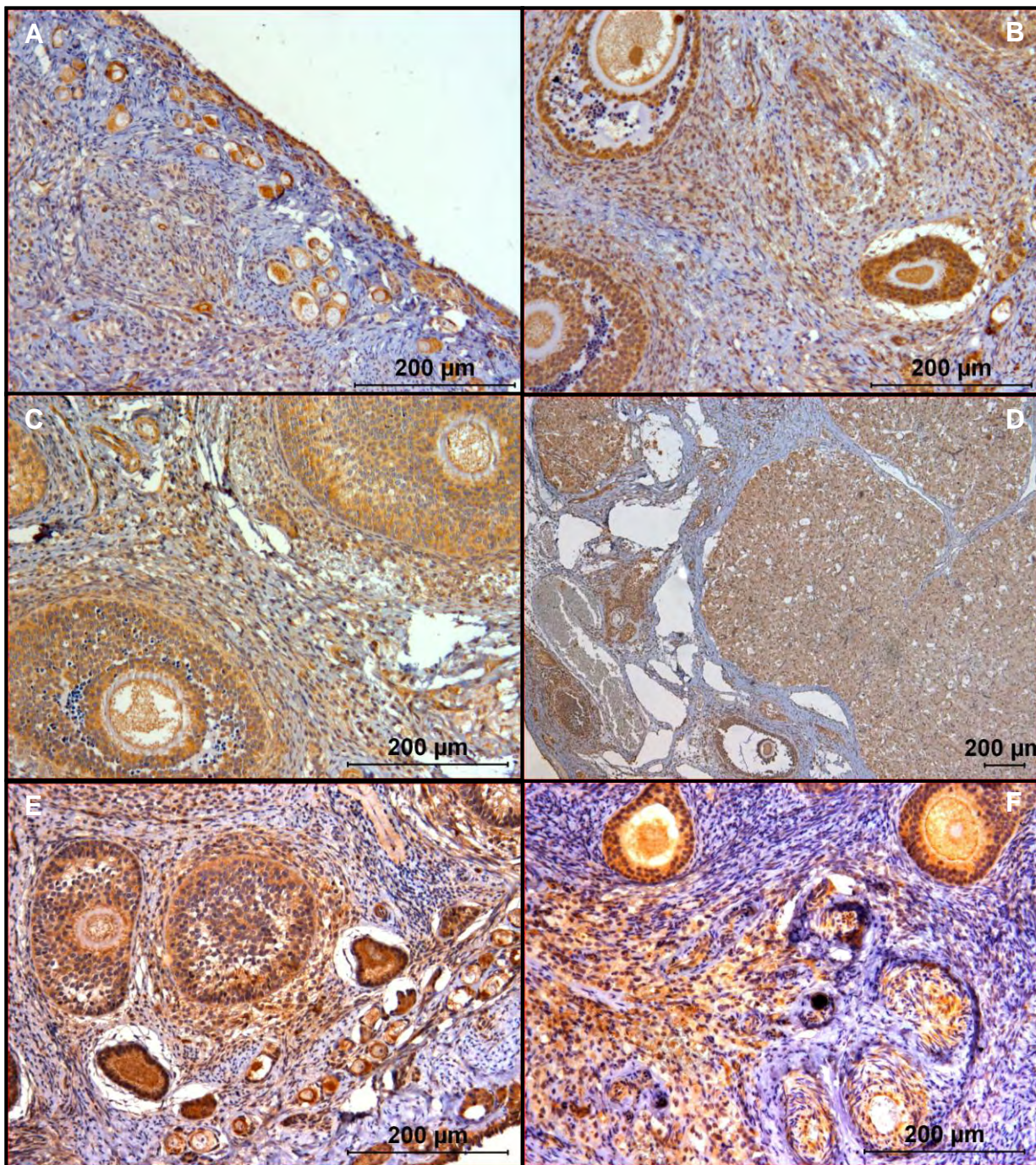


Figura 30. Marcação citoplasmática positiva da proteína *CYR61* nos componentes epiteliais e estromais do ovário das fêmeas caninas, 5x e 20x. (A) fêmeas pré-púberes, 20x, (B) fêmeas na fase de próestro, 20x, (C) fêmeas na fase de estro, 20x, (D) fêmeas na fase de diestro, 5x, (E) fêmeas na fase de anestro, 20x, (F) fêmeas acometidas por piometra, 20x.

Os resultados demonstram menor área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva na região cortical dos ovários de fêmeas pré-púberes, quando comparadas às fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra, que pode ser explicado devido à quiescência ovariana nas fêmeas pré-púberes, devido à imaturidade no eixo hipófise-hipotálamo-gonadal, que resulta em inatividade secretória pelas células dos folículos ovarianos, que são, na sua maioria, folículos primordiais e folículos primários, que apresentam uma ou mais camadas de células foliculares escamosas simples, caracterizadas por núcleos grandes e esféricos, resultando em menor área de citoplasma marcada.

As fases de estro e proestro não demonstraram diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância, demonstrando menor área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva na região cortical dos ovários, após as fêmeas pré-púberes, que pode ser explicado devido à semelhança nas características morfológicas dos ovários nestas fases do ciclo estral, apresentando folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, como folículos primordiais, folículos primários, folículos secundários e folículos de Graaf. A fase de estro apresentou maior expressão do CYR61 quando comparada à fase de proestro, que pode ser explicada pelo início da formação de corpo lúteo na região cortical dos ovários das fêmeas nesta fase do ciclo estral, com concomitante produção de progesterona.

Os resultados demonstram maior área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva na região cortical dos ovários de fêmeas caninas na fase de diestro, seguidas por fêmeas acometidas por piometra, que se encontravam, na sua maioria, no final da fase de diestro. As fêmeas na fase de diestro apresentaram região cortical do ovário ocupada por grande quantidade e volume de corpo lúteo constituído de células granulosas luteínas e células tecais luteínas secretoras de estradiol e progesterona. É possível afirmar que a expressão do CYR61 é regulada pelo estradiol na fase proliferativa e pelo estradiol e principalmente pela progesterona, na fase secretória.

A fase de anestro não diferiu significativamente pelo teste de Tukey a 5% de significância, das fases de estro e proestro. A fase de anestro, proestro e estro, caracterizadas por valores baixos de progesterona,  $1,06 \pm 0,79 \text{ ng/mL}$ ,  $1,95 \pm 1,58 \text{ ng/mL}$  e  $5,3 \pm 1,03 \text{ ng/mL}$ , respectivamente, apresentam diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de estradiol,  $27,14 \pm 48,40 \text{ pg/mL}$ ,  $49,71 \pm 47,05 \text{ pg/mL}$  e  $77,07 \pm 57,58 \text{ pg/mL}$ , respectivamente. É possível afirmar que a fase folicular, caracterizada pelo proestro, a fase de inatividade ovariana, caracterizada pelo anestro e início da fase lútea, caracterizada pelo estro, apresentam menor expressão da CYR61 quando comparadas à fase lútea secretória, caracterizada pelo diestro nas fêmeas caninas, devido à menor área representada pelas células foliculares secretoras de estrógeno nos diferentes folículos em desenvolvimento, quando comparados ao corpo lúteo no córtex ovariano, composto de células luteínas granulosa e células luteínicas tecais, secretoras de estrógeno e progesterona, que preenchem a região cortical em sua quase totalidade, e menor produção de progesterona quando comparadas à fase secretória.

Semelhante ao encontrado nos tecidos endometriais e miometriais do corno uterino e corpo do útero, a expressão do CYR61 é identificada na fase proliferativa, mas principalmente na fase secretória do ciclo estral da fêmea canina, assim como os resultados de GASHAW et al. (2006), que afirmam maior expressão do CYR61 no endométrio de fêmeas de babuíno na fase secretória quando comparada à fase folicular, demonstrando com este experimento, relação linear positiva entre concentrações plasmáticas de progesterona com a área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva nos ovários das fêmeas caninas.

Não foram encontrados estudos evidenciando a expressão do CYR61 em tecidos ovarianos normais de fêmeas de outras espécies, mas foi demonstrado que o CYR61 inibe a apoptose induzida por tratamento quimioterápico com cisplatina em carcinomas ovarianos (RHO et al., 2009), assim como o CYR61, sob regulação positiva do estrógeno, promove proliferação, migração celular e

angiogênese em adenocarcinomas mamários em mulheres, e que a inibição de sua expressão ou bioatividade resulte em tratamento ou prevenção dessas afecções (SAMPATH et al., 2001).

#### 5.4.2 Análise de intensidade e distribuição de marcação positiva

A Tabela 17 demonstra os resultados do teste estatístico de qui-quadrado a 5% de significância, na análise subjetiva de intensidade de marcação citoplasmática positiva do CYR61, forte, moderada e fraca, nos componentes estruturais do ovário de fêmeas caninas nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 17. Teste de qui-quadrado para comparação das médias±desvio padrão dos valores de intensidade de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do ovário, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

	EG	E	F	CL	GI
<b>Pré-púbere</b>	2,4±0,67 <b>B</b> (forte)	1,96±0,76 <b>B</b> (moderada)	2,33±0,55 <b>B</b> (moderada)	-	1,97±0,56 <b>B</b> (moderada)
<b>Proestro</b>	2,7±0,62 <b>AB</b> (moderada)	2,38±0,77 <b>A</b> (forte)	2,83±0,38 <b>A</b> (forte)	-	2,58±0,6 <b>A</b> (forte)
<b>Estro</b>	2,75±0,44 <b>AB</b> (forte)	2,44±0,5 <b>A</b> (moderada)	2,66±0,48 <b>A</b> (forte)	1,93±0,66 <b>ABD</b> (moderada)	2,03±0,6 <b>B</b> (moderada)
<b>Diestro</b>	2,78±0,42 <b>A</b> (forte)	2,53±0,5 <b>A</b> (forte)	2,69±0,47 <b>A</b> (forte)	2,66±0,55 <b>AC</b> (forte)	2,63±0,49 <b>A</b> (forte)
<b>Anestro</b>	2,69±0,54 <b>AB</b> (forte)	2,44±0,56 <b>A</b> (moderada)	2,56±0,56 <b>A</b> (forte)	1,72±0,58 <b>B</b> (moderada)	2,25±0,44 <b>B</b> (moderada)
<b>Piometra</b>	2,84±0,37 <b>A</b> (forte)	2,42±0,68 <b>A</b> (forte)	2,79±0,41 <b>A</b> (forte)	2,24±0,54 <b>D</b> (moderada)	2,18±0,51 <b>B</b> (moderada)

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância.

Os gráficos da Figura 31 demonstram correlação linear positiva entre intensidade de marcação citoplasmática positiva do CYR61 e valores séricos de progesterona, nos componentes estruturais do ovário de fêmeas caninas nas

diferentes fases do ciclo estral e piometra; e correlação linear neutra entre

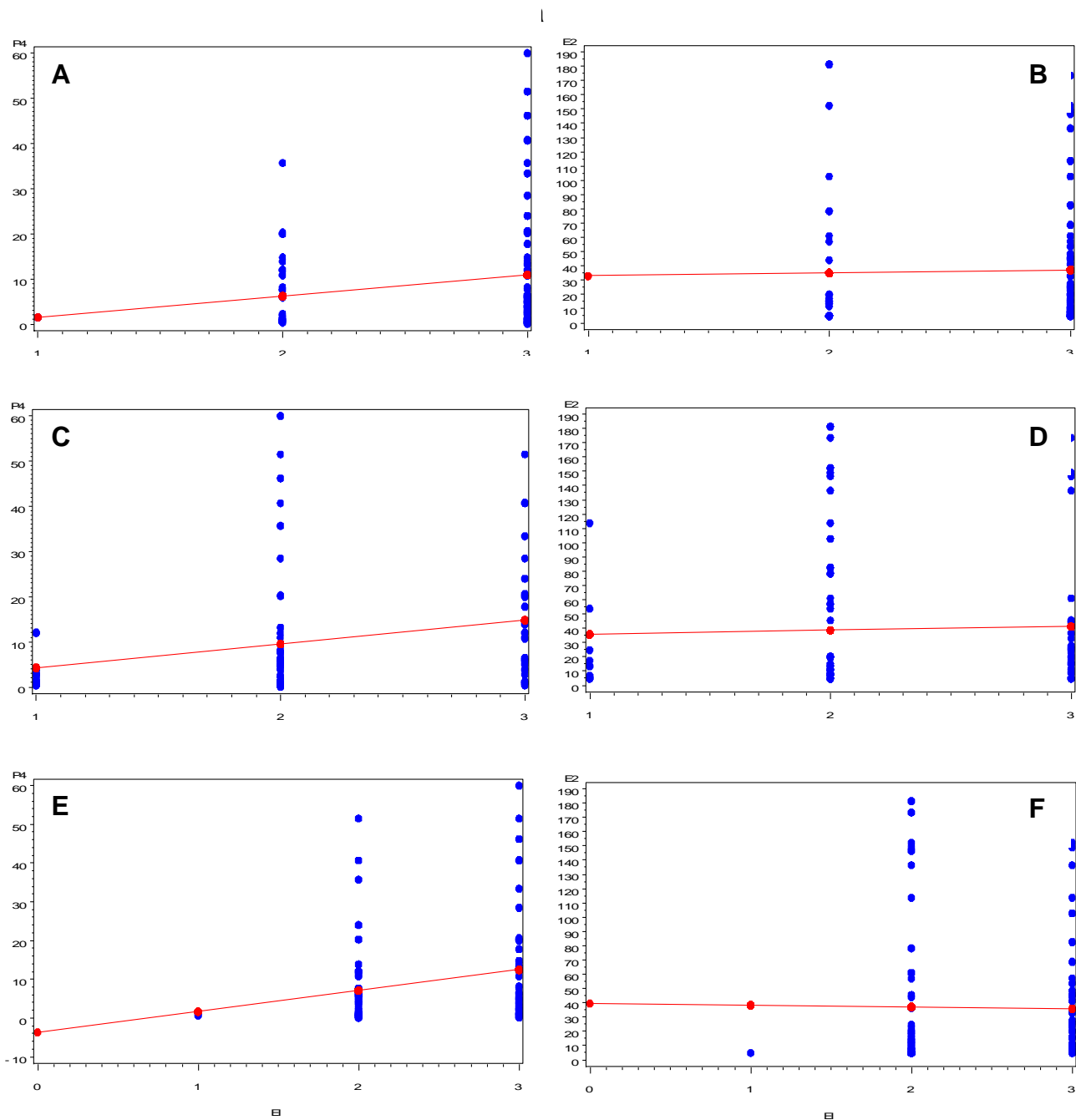


Figura 31. Gráfico da relação linear positiva e neutra da intensidade de marcação citoplasmática, demonstrada pelas fórmulas, com os valores séricos de progesterona e estradiol, respectivamente, nos componentes estruturais do ovário, com diferença significativa em algumas variáveis ( $p \leq 0,05$ ) e sem em outras ( $p > 0,05$ ). (A) folículos ovarianos comparada aos valores séricos de P4, (B) folículos ovarianos comparados aos valores séricos de E2, (C) corpo lúteo comparado aos valores séricos de P4, (D) corpo lúteo comparado aos valores séricos de E2, (E) fibroblastos do estroma ovariano, comparados aos valores séricos de P4 e, (F) fibroblastos do estroma ovariano, comparados aos valores de E2.

Os ovários na fase secretória do ciclo estral, apresentam maior intensidade de marcação citoplasmática da proteína CYR61, quando comparadas à fase proliferativa do ciclo estral, demonstrando correlação positiva com a progesterona, e negativa com o estradiol. Confirmando os resultados obtidos nas análises de área e porcentagem de área, nas quais os órgãos reprodutores apresentaram maior área e porcentagem de área com marcação citoplasmática positiva na fase secretória, quando comparada à fase proliferativa, enfatizando que os efeitos da progesterona potencializados pelo estradiol secretado anteriormente ou concomitantemente à fase lútea do ciclo estral, exerce regulação positiva sobre a proteína CYR61.

A Tabela 18 demonstra a comparação das médias±desvio padrão pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância, na marcação citoplasmática positiva do anticorpo anti-CYR61 com distribuição de 76-100% em todos os componentes estruturais presentes na região cortical do ovário, não apresentando diferença significativa entre as fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 18. Teste de qui-quadrado para comparação das médias±desvio padrão dos valores de distribuição de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do ovário, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

	EG	E	F	CL	GI
<b>Pré-púbere</b>	5 A (76-100%)	5 B (76-100%)	5 A (76-100%)	-	5 A (76-100%)
<b>Proestro</b>	4,96±0,2 A (76-100%)	4,33±1,09 A (76-100%)	5 A (76-100%)	4,78±0,73 A (76-100%)	4,96±0,2 A (76-100%)
<b>Estro</b>	5 A (76-100%)	4,81±0,54 B (76-100%)	5 A (76-100%)	4,86±0,36 A (76-100%)	5 A (76-100%)
<b>Diestro</b>	4,88±0,42 A (76-100%)	4,72±0,58 A (76-100%)	5 A (76-100%)	4,88±0,34 A (76-100%)	5 A (76-100%)
<b>Anestro</b>	5 A (76-100%)	5 B (76-100%)	5 A (76-100%)	5 A (76-100%)	5 A (76-100%)
<b>Piometra</b>	5 A (76-100%)	4,63±0,49 A (76-100%)	5 A (76-100%)	5 A (76-100%)	5 A (76-100%)

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância.

A Tabela 19 demonstra marcação nuclear positiva do anticorpo anti-CYR61 em alguns componentes estruturais presentes na região cortical do ovário das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 19. Comparação das médias±desvio padrão para presença ou ausência de marcação nuclear positiva nos componentes estruturais do ovário, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

	EG	E	F	CL	GI
<b>Pré-púbere</b>	1,37±0,49 (sim)	1,57±0,5 (não)	1,47±0,51 (sim)	-	1,63±0,49 (não)
<b>Proestro</b>	1,42±0,5 (sim)	1,54±0,51 (não)	1,38±0,49 (sim)	1,94±0,24 (não)	1,63±0,5 (não)
<b>Estro</b>	1,22±0,42 (sim)	1,28±0,46 (sim)	1,25±0,44 (sim)	1,6±0,5 (não)	1,63±0,5 (não)
<b>Diestro</b>	1,22±0,42 (sim)	1,41±0,5 (sim)	1,44±0,5 (sim)	1,56±0,5 (não)	1,56±0,5 (não)
<b>Anestro</b>	1,38±0,49 (sim)	1,47±0,51 (sim)	1,38±0,5 (sim)	1,88±0,37 (não)	1,66±0,48 (não)
<b>Piometra</b>	1,34±0,48 (sim)	1,39±0,5 (sim)	1,29±0,46 (sim)	1,47±0,51 (sim)	1,58±0,5 (não)

A Tabela 20 demonstra os resultados do teste estatístico de qui-quadrado a 5% de significância, na análise subjetiva de intensidade de marcação citoplasmática positiva do CYR61, forte, moderada e fraca, nos componentes estruturais do corno uterino de fêmeas caninas nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.



Tabela 20. Teste de qui-quadrado para comparação das médias±desvio padrão dos valores de intensidade de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do corno uterino, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

	ML	MC	EV	LP	GE	ER
<b>Pré-púbere</b>	2,57±0,54 <b>A</b> (forte)	2,73±0,45 <b>C</b> (forte)	2,73±0,45 <b>B</b> (forte)	2,7±0,53 <b>A</b> (forte)	2,83±0,38 <b>CD</b> (forte)	2,83±0,38 <b>B</b> (forte)
<b>Proestro</b>	2,42±0,58 <b>A</b> (moderada)	1,73±0,45 <b>A</b> (moderada)	1,73±0,83 <b>AC</b> (moderada)	2,04±0,82 <b>A</b> (moderada)	2,62±0,5 <b>A</b> (forte)	2,5±0,51 <b>A</b> (forte)
<b>Estro</b>	2,28±0,52 <b>A</b> (moderada)	2,03±0,4 <b>A</b> (moderada)	2,06±0,56 <b>A</b> (moderada)	1,88±0,83 <b>A</b> (moderada)	2,47±0,62 <b>AB</b> (forte)	2,44±0,67 <b>A</b> (forte)
<b>Diestro</b>	2,44±0,62 <b>A</b> (forte)	2,09±0,53 <b>A</b> (moderada)	2,47±0,57 <b>CD</b> (forte)	2,4±0,67 <b>A</b> (forte)	2,2±0,66 <b>B</b> (moderada)	2,34±0,55 <b>A</b> (moderada)
<b>Anestro</b>	2,5±0,51 <b>A</b> (forte)	2,25±0,51 <b>B</b> (moderada)	2,16±0,72 <b>AC</b> (moderada)	2,59±0,56 <b>A</b> (forte)	2,56±0,56 <b>AD</b> (forte)	2,56±0,56 <b>A</b> (forte)
<b>Piometra</b>	2,58±0,5 <b>A</b> (forte)	2,43±0,5 <b>A</b> (moderada)	2,58±0,5 <b>BD</b> (forte)	2,86±0,42 <b>B</b> (forte)	2,89±0,31 <b>D</b> (forte)	2,91±0,28 <b>C</b> (forte)

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância.

A Tabela 21 demonstra diferença significativa pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância, na distribuição da marcação citoplasmática positiva do anticorpo anti-CYR61, em todos os componentes estruturais presentes no corno uterino, nas fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 21. Teste de qui-quadrado para comparação das médias±desvio padrão dos valores de distribuição de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do corno uterino, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

	ML	MC	EV	LP	GE	ER
<b>Pré-púbere</b>	4,47±0,82 <b>B</b> (76-100%)	4,97±0,18 <b>BC</b> (76-100%)	2,7±0,79 <b>A</b> (26-50%)	2,73±1,23 <b>A</b> (26-50%)	4,8±0,48 <b>A</b> (76-100%)	4,63±0,81 <b>A</b> (76-100%)
<b>Proestro</b>	4,92±0,27 <b>AB</b> (76-100%)	4,73±0,6 <b>AC</b> (76-100%)	2,42±1,58 <b>AC</b> (26-50%)	2,08±1,13 <b>A</b> (6-25%)	4,77±0,51 <b>AB</b> (76-100%)	4,65±0,85 <b>AC</b> (76-100%)
<b>Estro</b>	4,84±0,37 <b>A</b> (76-100%)	4,88±0,34 <b>AB</b> (76-100%)	2,38±1,07 <b>A</b> (26-50%)	1,88±1,18 <b>A</b> (26-50%)	4,84±0,37 <b>AB</b> (76-100%)	4,81±0,54 <b>A</b> (76-100%)
<b>Diestro</b>	4,88±0,34 <b>AB</b> (76-100%)	4,63±0,75 <b>AC</b> (76-100%)	2,75±0,84 <b>B</b> (26-50%)	3,09±1,15 <b>A</b> (26-50%)	5 <b>B</b> (76-100%)	4,94±0,35 <b>C</b> (76-100%)
<b>Anestro</b>	4,94±0,25 <b>AB</b> (76-100%)	4,72±0,63 <b>AC</b> (76-100%)	3,09±0,96 <b>A</b> (26-50%)	3,53±0,76 <b>BC</b> (51-75%)	5 <b>AB</b> (76-100%)	4,59±0,87 <b>B</b> (76-100%)
<b>Piometra</b>	5 <b>C</b> (76-100%)	4,86±0,35 <b>C</b> (76-100%)	2,33±1,26 <b>C</b> (6-25%)	4,14±0,79 <b>C</b> (51-75%)	4,97±0,16 <b>B</b> (76-100%)	4,83±0,57 <b>C</b> (76-100%)

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância.

A Tabela 22 demonstra marcação nuclear positiva do anticorpo anti-CYR61 em alguns componentes estruturais presentes no corno uterino das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 22. Comparação das médias±desvio padrão para presença ou ausência de marcação nuclear positiva nos componentes estruturais do corno uterino, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

	ML	MC	EV	LP	GE	ER
<b>Pré-púbere</b>	1,53±0,51 (não)	1,43±0,54 (sim)	1,37±0,49 (sim)	1,37±0,49 (sim)	1,4±0,5 (sim)	1,4±0,5 (sim)
<b>Proestro</b>	1,62±0,5 (não)	1,8±0,4 (não)	1,5±0,51 (sim)	1,65±0,49 (não)	1,58±0,5 (não)	1,62±0,5 (não)
<b>Estro</b>	1,63±0,49 (não)	1,72±0,46 (não)	1,75±0,44 (não)	1,59±0,5 (não)	1,44±0,5 (sim)	1,59±0,5 (não)
<b>Diestro</b>	1,16±0,37 (sim)	1,44±0,5 (sim)	1,03±1,18 (sim)	1,44±0,5 (sim)	1,63±0,49 (não)	1,53±0,5 (não)
<b>Anestro</b>	1,38±0,49 (sim)	1,53±0,51 (não)	1,34±0,48 (sim)	1,28±0,46 (sim)	1,44±0,54 (sim)	1,31±0,47 (sim)
<b>Piometra</b>	1,05±0,23 (sim)	1,16±0,37 (sim)	1,28±0,45 (sim)	1,16±0,37 (sim)	1,05±0,23 (sim)	1,14±0,36 (sim)

A Tabela 23 demonstra os resultados do teste estatístico de qui-quadrado a 5% de significância, na análise subjetiva de intensidade de marcação citoplasmática positiva do CYR61, forte, moderada e fraca, nos componentes estruturais do corpo do útero de fêmeas caninas nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 23. Teste de qui-quadrado para comparação das médias±desvio padrão dos valores de distribuição de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do corpo do útero, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

	ML	MC	EV	LP	GE	ER
<b>Pré-púbere</b>	2,57±0,57 <b>A</b> (forte)	2,7±0,47 <b>C</b> (forte)	2,5±0,51 <b>B</b> (forte)	2,3±0,79 <b>A</b> (moderada)	2,57±0,68 <b>CD</b> (forte)	2,47±0,73 <b>B</b> (forte)
<b>Proestro</b>	2,42±0,50 <b>A</b> (moderada)	1,92±0,27 <b>A</b> (moderada)	1,15±0,61 <b>AC</b> (moderada)	2±0,8 <b>A</b> (moderada)	2,38±0,5 <b>A</b> (moderada)	2,5±0,58 <b>A</b> (forte)
<b>Estro</b>	2,44±0,50 <b>A</b> (moderada)	1,78±0,55 <b>A</b> (moderada)	1,91±0,64 <b>A</b> (moderada)	1,97±0,86 <b>A</b> (moderada)	2,44±0,50 <b>AB</b> (moderada)	2,28±0,58 <b>A</b> (moderada)
<b>Diestro</b>	2,34±0,60 <b>A</b> (moderada)	2,13±0,49 <b>A</b> (moderada)	2,16±0,68 <b>CD</b> (moderada)	2,06±0,8 <b>A</b> (moderada)	2,19±0,54 <b>B</b> (moderada)	2,22±0,61 <b>A</b> (moderada)
<b>Anestro</b>	2,47±0,51 <b>A</b> (moderada)	2,22±0,42 <b>B</b> (moderada)	2,31±0,69 <b>AC</b> (moderada)	2,59±0,5 <b>A</b> (forte)	2,56±0,50 <b>AD</b> (forte)	2,44±0,62 <b>A</b> (forte)
<b>Piometra</b>	2,65±0,48 <b>A</b> (forte)	2,05±0,32 <b>A</b> (moderada)	2,48±0,64 <b>BD</b> (forte)	2,5±0,55 <b>B</b> (forte)	2,55±0,5 <b>D</b> (forte)	2,53±0,51 <b>C</b> (forte)

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância.

A Tabela 24 demonstra diferença significativa pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância, na distribuição da marcação citoplasmática positiva do anticorpo anti-CYR61, em todos os componentes estruturais presentes no corno uterino, nas fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 24. Teste de qui-quadrado para comparação das médias±desvio padrão dos valores de distribuição de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais do corpo do útero, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

	ML	MC	EV	LP	GE	ER
<b>Pré-púbere</b>	4,53±0,82 <b>B</b> (76-100%)	4,87±0,35 <b>BC</b> (76-100%)	2,8±0,85 <b>A</b> (26-50%)	2,43±1,25 <b>A</b> (26-50%)	4,47±0,78 <b>A</b> (76-100%)	4,57±0,9 <b>A</b> (76-100%)
<b>Proestro</b>	4,73±0,45 <b>AB</b> (76-100%)	4,65±0,56 <b>AC</b> (76-100%)	2,62±1,13 <b>AC</b> (26-50%)	2,23±1,27 <b>A</b> (6-25%)	4,96±0,2 <b>AB</b> (76-100%)	4,62±0,85 <b>AC</b> (76-100%)
<b>Estro</b>	4,81±0,39 <b>A</b> (76-100%)	4,78±0,49 <b>AB</b> (76-100%)	2,5±1,14 <b>A</b> (26-50%)	1,59±0,95 <b>A</b> (1-5%)	4,91±0,3 <b>AB</b> (76-100%)	4,13±1,21 <b>A</b> (76-100%)
<b>Diestro</b>	4,59±0,56 <b>AB</b> (76-100%)	4,56±0,62 <b>AC</b> (76-100%)	2,53±0,8 <b>B</b> (26-50%)	2,44±1,24 <b>A</b> (26-50%)	4,84±0,37 <b>B</b> (76-100%)	4,94±0,25 <b>C</b> (76-100%)
<b>Anestro</b>	4,81±0,4 <b>AB</b> (76-100%)	4,78±0,49 <b>AC</b> (76-100%)	2,75±1,02 <b>A</b> (26-50%)	3,81±0,78 <b>BC</b> (51-75%)	4,75±0,51 <b>AB</b> (76-100%)	4,16±1,05 <b>B</b> (76-100%)
<b>Piometra</b>	4,83±0,47 <b>C</b> (76-100%)	4,58±0,87 <b>C</b> (76-100%)	2,53±1,32 <b>C</b> (6-25%)	3,23±1,1 <b>C</b> (26-50%)	4,74±0,76 <b>B</b> (76-100%)	4,95±0,23 <b>C</b> (76-100%)

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância.

A Tabela 25 demonstra marcação nuclear positiva do anticorpo anti-CYR61 em alguns componentes estruturais presentes no corpo do útero das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 25. Comparação das médias±desvio padrão para presença ou ausência de marcação nuclear positiva nos componentes estruturais do corpo do útero, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

	ML	MC	EV	LP	GE	ER
<b>Pré-púbere</b>	1,63±0,49 (não)	1,5±0,51 (não)	1,47±0,51 (sim)	1,5±0,51 (não)	1,5±0,51 (não)	1,5±0,51 (não)
<b>Proestro</b>	1,5±0,51 (não)	1,73±0,45 (não)	1,69±0,47 (não)	1,65±0,49 (não)	1,58±0,5 (não)	1,65±0,49 (não)
<b>Estro</b>	1,53±0,51 (não)	1,72±0,46 (não)	1,63±0,49 (não)	1,72±0,46 (não)	1,67±0,48 (não)	1,63±0,49 (não)
<b>Diestro</b>	1,34±0,48 (sim)	1,47±0,5 (sim)	1,53±0,5 (não)	1,59±0,5 (não)	1,66±0,48 (não)	1,63±0,49 (não)
<b>Anestro</b>	1,31±0,47 (sim)	1,56±0,5 (não)	1,41±0,5 (sim)	1,34±0,48 (sim)	1,41±0,5 (sim)	1,34±0,48 (sim)
<b>Piometra</b>	1,3±0,46 (sim)	1,35±0,48 (sim)	1,25±0,44 (sim)	1,5±0,51 (não)	1,53±0,51 (não)	1,42±0,5 (sim)

A Tabela 26 demonstra os resultados do teste estatístico de qui-quadrado a 5% de significância, na análise subjetiva de intensidade de marcação citoplasmática positiva do CYR61, forte, moderada e fraca, nos componentes estruturais da tuba uterina de fêmeas caninas nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 26. Teste de qui-quadrado para comparação das médias±desvio padrão dos valores de distribuição de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais da tuba uterina, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

	ML	MC	EV	LP	S	ER
<b>Pré-púbere</b>	2,89±0,31 <b>A</b> (forte)	2,75±0,52 <b>C</b> (forte)	2,79±0,5 <b>B</b> (forte)	2,04±1,35 <b>A</b> (forte)	1,54±1,4 <b>A</b> (moderada)	2,82±0,48 <b>B</b> (forte)
<b>Proestro</b>	3 <b>A</b> (forte)	2,6±0,5 <b>B</b> (forte)	2,8±0,5 <b>AC</b> (forte)	1,72±1,17 <b>A</b> (moderada)	1,37±1,53 <b>A</b> (fraca)	2,58±0,72 <b>A</b> (forte)
<b>Estro</b>	2,87±0,35 <b>A</b> (forte)	2,4±0,5 <b>A</b> (moderada)	2,8±0,41 <b>AC</b> (forte)	1,4±1,45 <b>A</b> (fraca)	1,7±1,44 <b>A</b> (forte)	2,8±0,41 <b>A</b> (forte)
<b>Diestro</b>	2,81±0,4 <b>A</b> (forte)	2,41±0,5 <b>A</b> (moderada)	2,84±0,37 <b>A</b> (forte)	2,22±1,24 <b>A</b> (forte)	2,97±0,18 <b>B</b> (forte)	2,78±0,42 <b>A</b> (forte)
<b>Anestro</b>	2,61±0,67 <b>A</b> (forte)	2,48±0,63 <b>A</b> (forte)	2,16±1,07 <b>CD</b> (moderada)	1,87±1,2 <b>A</b> (moderada)	2,63±0,81 <b>B</b> (forte)	2,43±0,77 <b>A</b> (forte)
<b>Piometra</b>	2,65±0,49 <b>A</b> (forte)	2±0,74 <b>A</b> (moderada)	2,29±1,12 <b>BD</b> (forte)	1,68±1,34 <b>B</b> (moderada)	2,56±1,01 <b>B</b> (forte)	2,61±0,5 <b>C</b> (forte)

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância.

A Tabela 27 demonstra diferença significativa pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância, na distribuição da marcação citoplasmática positiva do anticorpo anti-CYR61, em todos os componentes estruturais presentes na tuba uterina, nas fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 27. Teste de qui-quadrado para comparação das médias±desvio padrão dos valores de distribuição de marcação citoplasmática positiva nos componentes estruturais da tuba uterina, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

	ML	MC	EV	LP	S	ER
<b>Pré-púbere</b>	4,61±0,69 <b>B</b> (76-100%)	4,86±0,36 <b>BC</b> (76-100%)	1,39±0,63 <b>A</b> (0-5%)	1,18±1,06 <b>A</b> (0-5%)	2,43±2,28 <b>A</b> (51-75%)	5 <b>A</b> (76-100%)
<b>Proestro</b>	4,4±0,65 <b>AB</b> (51-75%)	4,8±0,41 <b>AC</b> (76-100%)	1,84±0,94 <b>A</b> (6-25%)	1,36±1,22 <b>BC</b> (0-5%)	2,08±2,36 <b>A</b> (76-100%)	5 <b>B</b> (76-100%)
<b>Estro</b>	4,83±0,38 <b>AB</b> (76-100%)	4,57±0,68 <b>AC</b> (76-100%)	1,9±0,92 <b>AC</b> (6-25%)	0,6±0,72 <b>A</b> (0-5%)	4,91±0,3 <b>A</b> (76-100%)	4,97±0,18 <b>AC</b> (76-100%)
<b>Diestro</b>	4,62±0,66 <b>A</b> (76-100%)	4,66±0,48 <b>AB</b> (76-100%)	1,59±0,8 <b>A</b> (0-5%)	1,06±0,76 <b>A</b> (0-5%)	3,66±1,45 <b>A</b> (51-75%)	5 <b>A</b> (76-100%)
<b>Anestro</b>	4,58±0,67 <b>AB</b> (76-100%)	4,74±0,44 <b>AC</b> (76-100%)	1,23±0,72 <b>B</b> (0-5%)	1±0,79 <b>A</b> (0-5%)	3,07±1,6 <b>A</b> (26-50%)	4,8±0,92 <b>C</b> (76-100%)
<b>Piometra</b>	4,71±0,52 <b>C</b> (76-100%)	4,74±0,48 <b>C</b> (76-100%)	1,09±0,62 <b>C</b> (6-25%)	1±1,13 <b>C</b> (6-25%)	3,38±1,83 <b>A</b> (51-75%)	5 <b>C</b> (76-100%)

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância.

A Tabela 28 demonstra marcação nuclear positiva do anticorpo anti-CYR61 em alguns componentes estruturais presentes na tuba uterina das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

Tabela 28. Comparação das médias±desvio padrão para presença ou ausência de marcação nuclear positiva nos componentes estruturais da tuba uterina, nas diferentes fases do ciclo estral e piometra.

	ML	MC	EV	LP	S	ER
<b>Pré-púbere</b>	1,39±0,5 (sim)	1,5±0,51 (não)	1,39±0,5 (sim)	1,64±0,49 (não)	1,5±0,51 (não)	1,57±0,5 (não)
<b>Proestro</b>	1,08±0,28 (sim)	1,52±0,51 (não)	1,16±0,37 (não)	1,56±0,51 (não)	1,54±0,51 (não)	1,33±0,48 (sim)
<b>Estro</b>	1 (sim)	1,27±0,45 (sim)	1,03±0,18 (sim)	1,57±0,50 (não)	1,43±0,5 (sim)	1,07±0,25 (sim)
<b>Diestro</b>	1,31±0,47 (sim)	1,44±0,5 (sim)	1,13±0,34 (sim)	1,34±0,48 (sim)	1 (sim)	1,31±0,47 (sim)
<b>Anestro</b>	1,42±0,5 (sim)	1,61±0,5 (não)	1,61±0,5 (não)	1,53±0,51 (não)	1,27±0,5 (sim)	1,6±0,5 (não)
<b>Piometra</b>	1,41±0,5 (sim)	1,76±0,43 (não)	1,53±0,51 (não)	1,62±0,49 (não)	1,22±0,42 (sim)	1,48±0,51 (sim)

Os gráficos da Figura 32 demonstram correlação linear neutra ou negativa entre intensidade de marcação citoplasmática positiva do CYR61 e valores séricos de progesterona e estradiol, nos componentes estruturais do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina de fêmeas caninas nas diferentes fases do ciclo estral e piometra. Conclui-se que não é possível associar a influência da progesterona e estradiol no corno uterino, corpo do útero e tuba uterina na intensidade de marcação citoplasmática da proteína CYR61, através dos dados obtidos por análise subjetiva neste experimento. Para confirmação desses resultados, faz-se necessário a utilização de análise de intensidade através de softwares específicos, como o “software Image J 1.40”.

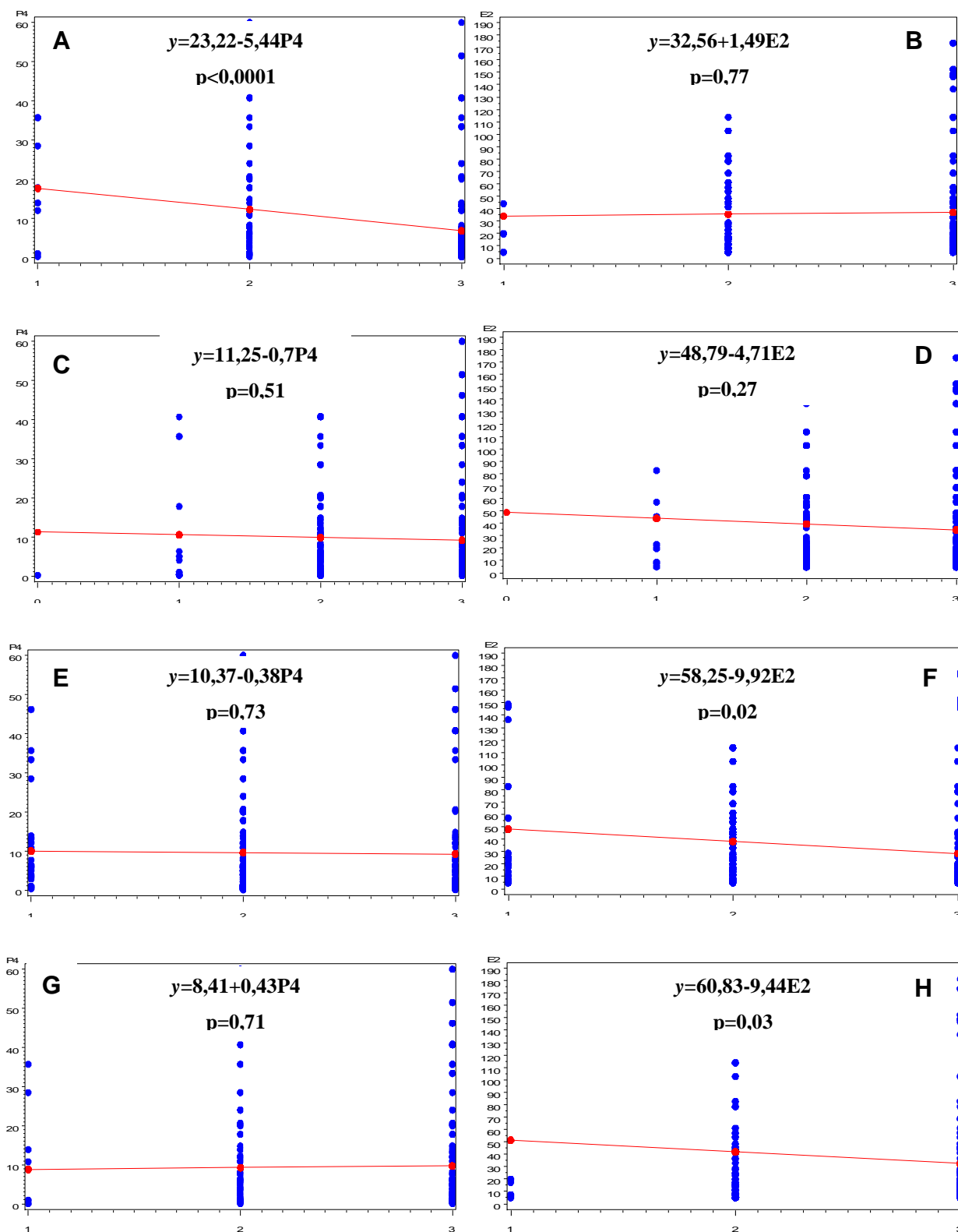


Figura 32. Gráfico da relação linear negativa e neutra, demonstrada nas fórmulas, da intensidade de marcação citoplasmática positiva, com os valores séricos de progesterona e estradiol, respectivamente, nos componentes endometriais e miometriais do corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, significativa ( $p\leq 0,05$ ) e não significativa ( $p>0,05$ ). (A) glândulas endometriais comparada aos valores séricos de P4, (B) glândulas endometriais comparados aos valores séricos de E2, (C) epitélio de revestimento comparado aos valores séricos de P4, (D) epitélio de revestimento comparado aos valores séricos de E2, (E) miométrio circular comparados aos valores séricos de P4, (F) miométrio circular comparados aos valores de E2, (G) miométrio longitudinal comparado aos valores séricos de P4 e, (H) miométrio longitudinal comparado aos valores séricos de E2.

Tabela 29. Síntese das fases correspondendo à intensidade de marcação por análise subjetiva, nos componentes estruturais de cada órgão, média da distribuição encontrada em cada componente de cada tecido.

		<b>Forte</b>	<b>Fraca</b>	<b>Moderada</b>	<b>Média distribuição</b>
<b>Ovário</b>	Epitélio germinativo	<b>PP, E, A, D, PIO</b>	-	<b>PE</b>	76-100%
	Fibroblastos estroma	<b>PE, D, PIO</b>	-	<b>E, A, PP</b>	76-100%
	Folículos	<b>PE, E, D, A, PIO</b>	-	<b>PP</b>	76-100%
	Corpo lúteo	<b>D</b>	-	<b>PP, PE, E, A, PIO</b>	76-100%
	Glândulas intersticiais	<b>PE, D</b>	-	<b>PP, E, A, PIO</b>	76-100%
<b>Corno uterino</b>	Miométrio longitudinal	<b>PP, D, A, PIO</b>	-	<b>PE, E</b>	76-100%
	Miométrio circular	<b>PP</b>	-	<b>PE, E, D, A, PIO</b>	76-100%
	Estrato vascular	<b>PP, PIO, D</b>	-	<b>PE, E, A</b>	26-50%
	Fibroblastos da Lâmina própria	<b>PP, D, A, PIO</b>	-	<b>PE, E</b>	26-50%
	Glândulas endometriais	<b>PP, PE, E, A, PIO</b>	-	<b>D</b>	76-100%
	Epitélio de revestimento	<b>PP, PE, E, A, PIO</b>	-	<b>D</b>	76-100%
<b>Corpo do útero</b>	Miométrio longitudinal	<b>PP, PIO</b>	-	<b>PE, E, D, A</b>	76-100%
	Miométrio circular	<b>PP</b>	-	<b>PE, E, D, A, PIO</b>	76-100%
	Estrato vascular	<b>PP, PIO</b>	-	<b>PE, E, D, A</b>	26-50%
	Fibroblastos da Lâmina própria	<b>A, PIO</b>	-	<b>PP, PE, E, D</b>	26-50%
	Glândulas endometriais	<b>PP, A, PIO</b>	-	<b>PE, E, D</b>	76-100%
	Epitélio de revestimento	<b>PP, PE, A, PIO</b>	-	<b>E, D</b>	76-100%
<b>Tuba uterina</b>	Miométrio longitudinal	<b>PP, PE, E, D, A, PIO</b>	-	-	76-100%
	Miométrio circular	<b>PP, PE, A</b>	-	<b>E, D, PIO</b>	76-100%
	Estrato vascular	<b>PP, PE, E, D, PIO</b>	-	<b>A</b>	6-25%
	Fibroblastos da Lâmina própria	<b>PP, D</b>	<b>E</b>	<b>PE, A, PIO</b>	0-5%
	Serosa	<b>E, D, A, PIO</b>	<b>PE</b>	<b>PP</b>	51-75%
	Epitélio de revestimento	<b>PP, PE, E, D, A, PIO</b>	-	-	76-100%

O anticorpo anti-CYR61 mostrou-se efetivo em marcar componentes epiteliais nas fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra, mesmo que em diferentes intensidades de marcação entre e dentro de cada componente avaliado. Este achado pode ser explicado por existir evidências apontando que esta proteína está distribuída de forma diferente na matriz extracelular, em partes das células ou na superfície da mesma (YANG &



LAU, 1991). Existe uma estreita relação da proteína e seus principais receptores e ligantes, e por isso, acredita-se que a proteína seja sintetizada perto de seu local de ação (KIREEVA et al., 1997).

## VI. CONCLUSÕES

Pelo presente estudo podemos concluir que:

- 1) Os tecidos de ovário, corno uterino, corpo do útero e tuba uterina, das fêmeas caninas pré-púberes, nas diferentes fases do ciclo estral e acometidas por piometra, apresentaram imunorreação positiva nos componentes estromais e epiteliais para a proteína CYR61.
- 2) Foi demonstrada correlação entre a proteína CYR61 e os níveis séricos de estradiol e progesterona, nas diferentes fases do ciclo estral, período pré-puberdade e piometra.
- 3) Existe correlação linear positiva entre a expressão do CYR61 nos órgãos reprodutores e valores séricos de progesterona, demonstrando maior expressão da proteína na fase secretória, fase lútea do ciclo estral, caracterizada por altos valores deste hormônio.
- 4) Existe correlação linear positiva, neutra ou negativa, de acordo com o tecido estudado, entre a expressão CYR61 nos órgãos reprodutores e valores séricos de estradiol.
- 5) A expressão do CYR61 está diretamente relacionada com as alterações morfológicas e funcionais dos órgãos reprodutores femininos, provocadas pelos hormônios ovarianos nas diferentes fases do ciclo estral, de forma particular sobre cada tecido, de acordo com suas funções fisiológicas.
- 6) Os ovários, responsáveis por produção dos hormônios estradiol e progesterona, apresentaram maior expressão da CYR61, caracterizada

por maior intensidade de marcação e maior área e porcentagem de área marcada, quando comparados aos demais órgãos reprodutores, que sofrem influência desses hormônios.

- 7) Fêmeas acometidas por piometra apresentam maior expressão da proteína CYR61 nos órgãos reprodutores.
- 8) O CYR61 regulado por níveis de estrógeno e progesterona é um potente marcador para o desenvolvimento e instalação da hiperplasia endometrial cística e/ou piometra.

## VII. REFERÊNCIAS

- ABSENGER Y. et al. Cyr61, a deregulated gene in endometriosis. **Mol Hum Reprod**; v.10, p.399-407, 2004.
- ALLEN, W. E. **Fertilidade e obstetrícia no cão**. São Paulo: Varela, 197 p., 1995.
- ALVES, N.G. et al. Intervalos do início e do final do estro à ovulação em vacas das raças Gir e Guzerá após luteólise natural ou induzida por prostaglandina. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.55, n.4, p.430-437, 2003.
- ANDREWS, D.A. et al. Plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. **Continuing education for the practicing veterinarian**, v.16, n.10, p.1349-1357, 1994.
- ANTONIOLLI, C.B. Seminário apresentado na disciplina de Endocrinologia da reprodução (VET00169) do programa de pós-graduação em ciências veterinárias da UFRGS, 2002.
- ARORA, N. et al. A model for cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**, v.66, p.1530-1536, 2006.
- AUGSBURGER, R.H.; KURZI, M. Histomorphologic and morphometric evaluation of the uterine horns in nulliparous and multiparous beagles. **Am. J. Vet. Res**, v.65, n.5, p.552-558, 2004.

- BABIC, A.M.; CHEN, C.C.; LAU, L.F. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. **Molecular and Cellular Biology**, Whashington, v.19, n.4, p.2958-66, 1999.
- BABIC, A.M. et al. CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Whashington, v.95, n.11, p.6355-60, 1998.
- BACHA, W.J.; BACHA, L.M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2ed., Roca, São Paulo, Brasil, 457p., 2003.
- BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2ed., São Paulo:Manole, 655p., 1992.
- BARRAU, M.D.; ABEL, J.H.; VERHAGE, H.G. et al. Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch. **Am J Anat**, v.142, p.47-66, 1975.
- BAUSERO, P. et al. Paracrine action of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: production and target sites, and hormonal regulation. **Angiogenesis**, v.2, p.167-182, 1998.
- BEDAIWY, M.A.; FALCONE, T. Peritoneal fluid environment in endometriosis. Clinicopathological implications. **Minerva Ginecol**, v.55, p.333-345, 2003.
- BEHREND, E.N.; GRAUER, G.F.; MANI, I.; et al. Hospital-acquire acute renal failure in dogs: 29 cases (1983-1992). **J A V M A**, v.208, n.4, p.537-541, 1996.
- BENITES, N. R. Medicamentos empregados para sincronização do ciclo estral e transferência de embriões. *In*: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p.301-313, 2002.
- BICUDO, S.D. **Estudo da estacionalidade Reprodutiva em carneiros ideal: Níveis séricos de testosterona, androstenediona, triiodotironina, tiroxina; biometria testicular; avaliação das características do sêmen e de parâmetros indicativos de adaptação ao clima**. 1999. Tese (Livre Docência) - Faculdade de medicina Veterinaria e Zootecnia, FMVZ/UNESP, Botucatu, 1999.

BRADY, C.A.; OTTO, C.M. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and multiple organ dysfunctions. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v.31, p.1147-1162, 2001.

BRIGSTOCK D.R. The CCN family: a new stimulus package. **J Endocrinol**, v.178, p.169–175, 2003.

BRIGSTOCK D.R. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. **Endocr Rev**, v.20, p.189-206, 1999.

BYSTED, B.V. Aspects of oocyte maturation, ovulation, fertilization and early embryonic development in the dog. In: **Reproduction hos.** Dansk Veterinærforening for Husdyrreproduktion. Proceedings. Escandinavia, p.69-87, 1999.

CASTRO, F.C. et al. Eficiencia de la citología vaginal para el diagnóstico de gestación en cerdas a los 20 y 25 días post-servicio. **Vet. Mex.** n.1, p.95-97, 1996.

CICATIELLO L. et al. Transcriptional activation of jun and actin genes by estrogen during mitogenic stimulation of rat uterine cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.1, p.523±528, 1992.

CHIEN, W. et al. CYR61 suppresses growth of human endometrial cancer cells. **The Journal of Biological Chemistry.** v.279, p.53087-53096, 2004.

CHUNG, K.C.; AHN, Y.S. Expression of immediate early gene cyr61 during the differentiation of immortalized embryonic hippocampal neuronal cells. **Neuroscience Letters**, San Diego, v.255, n.3, p.155-8, 1998.

CONCANNON, P.W.; DiGREGÓRIO, G.B. Canine vaginal cytology. In: BURKE, T.J. **Small animal reproduction and fertility.** Philadelphia: Lea&Febiger, p.96-111, 1986.

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

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

- COONS, A.H. The beginnings of immunofluorescence. **Journal Immunology**, v.87, p.499, 1961.
- CHRISTIANSEN, I.J. **Reproduction in the dog & cat**. São Paulo:Bailliere Trindall, cap.7, p.154-170, 1984.
- CREUS M, et al. Alphavbeta3 integrin expression and pinopod formation in normal and out-of-phase endometria of fertile and infertile women. **Hum Reprod**, v.17, p.2279–2286, 2002.
- CRITCHLEY, H.O. et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human endometrium and its regulation by prostaglandin E-series prostanoid receptor 2 (EP2). **Endocrinology**, v.147, p.744–753, 2006.
- DAVIDSON, A.P.; STABENFELDT, G.H. Controle e Desenvolvimento de Gônadas e Gametas. In: CUNNINGHAM, J.C. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p.353-359, 1999.
- DE BOSSCHERE, H. et al. Cystic endometrial – pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? **Theriogenology**, v.55, p.1509-1519, 2001.
- DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; et al. Estrogen-alpha and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch, **Anim Reprod Sci**, v.70, p.251-259, 2002.
- DUAN, R. et al. Estrogen regulation of c-fos gene expression through phosphatidylinositol-3-kinase-dependent activation of serum response factor in MCF-7 breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.294, p.384±394, 2002.
- DYCE K.M.; SACK W.O.; WENSING C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3ed. Rio de Janeiro:Elsevier, cap.8, 2004.
- EGENVALL, A.; HAGMAN, R.; BONNETT, B.N. et al. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **J Vet Intern Med**, v.15, p.530-538, 2001.
- ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3ed. São Paulo: Manole, v.4, p.1857-1869, 1992.

- FALDYNA, M.; LAZNICKA, A.; TOMAN, M. Imunosuppression in bitches with pyometra. **J Small Animal Pract**, v.42, n.1, p.5-10, 2001.
- FAZLEABAS, A.T. et al. A modified baboon model for endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v.955, p.308–317; discussion 340–342, 396–406, 2002.
- FAZLEABAS, A.T. et al. Steroid receptor and aromatase expression in baboon endometriotic lesions. **Fertil Steril**, v.80, p.820–827, 2003.
- FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v.60-61, p.375-387, 2000.
- FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3rd ed. Philadelphia, USA: W.B. Saunders Company, 1104p., 2004.
- FIENI, F. Patología de los ovarios y el útero In: WANKE, M.M.; GOBELLO, C. **Reproducción en caninos y felinos domésticos**. Buenos Aires: Inter.- Médica, cap.6, p.75-95, 2006.
- FORTUNE, J.E.; RIVERA-GONZALEZ, M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2004, Porto Seguro. Anais. Porto Seguro: **Animal Reproduction Science**, p.109-126, 2004.
- FRAGOSO, E.N. et al. Reprodução de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) do Córrego da Lagoa, São Carlos/SP. II. Estrutura dos testículos e escala de maturação. **CONGRESSO BRASILEIRO ZOOLOGIA**, 3, Itajaí. Resumos. Itajaí: Univali, 2000.
- FRANSSON, B.A.; RAGLE, C. Canine piometra: an update on pathogenesis and treatment. **Compendium**, v.25, n.8, p.602-611, 2003.
- GASHAW, I. et al. Induced endometriosis in the Baboon (*Papio anubis*) increases the expression of the proangiogenic factor CYR61 (CCN1) in eutopic and ectopic endometria. **Biology of reproduction**, v.74, p.1060-1066, 2006.
- GELLHAUS A. et al. Decreased expression of the angiogenic regulator CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) in human placenta is associated with pre-eclampsia. **Molecular Human Reproduction**, v.12, p.389-399, 2006.

- GIANCOTTI F.G., RUOSLAHTI E. Integrin signaling. **Science**, v.285, p.1028-1032, 1999.
- GIMENO, E.J. Fundamentos de imunoistoquímica aplicada a patologia veterinária. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGISTAS VETERINÁRIOS, 7.,1995, Belo Horizonte. **Anais do VII Encontro Nacional de Patologistas Veterinários**, Belo Horizonte v.7, p.17-51, 1995.
- GIUDICE, L.C.; KAO, L.C. Endometriosis. **Lancet**, v.364, p.1789–1799, 2004.
- GONZÁLEZ, F.H.D. **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. 2002. Disponível em: [www.ufrgs.br/favet/bioquimica/posgrad/](http://www.ufrgs.br/favet/bioquimica/posgrad/). Acesso em 3 de jan. 2003.
- GOODMAN, R.L.; KARSCH, F.J. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: Differential suppression by ovarian steroids. **Endocrinology**, v.107, p.1286-1290, 1980.
- GOODWIN, J.K.; SCHAER, M. Septic shock, **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.19, p. 1239–1258, 1989.
- HAFEZ, E.S.; HAFEZ, B. Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução. In: HAFEZ, E.S.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. Barueri, SP. Manole, p.37-38, 2004.
- HAGMAN, R.; GREKO, C. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from bitches with pyometra and from urine samples from other dogs. **Vet Rec**, v.157, p.193-197, 2005.
- HAGMAN, R.; KINDAHL, H.; LAGERSTEDT, A.S. Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F2alpha metabolite levels. **Acta Vet Scand** v.47, p.55-67, 2006.
- HARDY, R.M.; OSBORNE, C.A. Canine pyometra: pathophysiological diagnosis and treatment of uterine and extra-uterine lesions. **J Am Hosp Assoc**, v.10,p.245-267, 1974.
- HEDLUND, C.S. Cirurgia dos sistemas reprodutivo e genital. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Rocca, p.571-594, 2002.

- HIB, J. Sistema reprodutor feminino. In: HIB, J. **Di Fiore Histologia texto e atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.19, p.414-451, 2003.
- HILL, L.L.; ROGERS, P.A. Endometrial vascular and glandular expression of integrin alpha(v)beta3 in women with and without endometriosis. **Hum Reprod**, v.13, p.1030–103, 1998.
- HILFIKER A. et al. Expression of CYR61, an angiogenic immediate early gene, in arteriosclerosis and its regulation by angiotensin II. **Circulation**, v.106, p.254–260, 2002.
- HISHINUMA, M. et al. Recovery, morphological quality, and in vitro maturation of follicular oocytes from bitches with pyometra. **Theriogenology**, v.62, n.3-4, p.614-623, 2004.
- HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.42, n.1-4, p.275-288, 1996.
- HOLLOWAY, S.E. et al. Increased expression of Cyr61 (CCN1) identified in peritoneal metastases from human pancreatic cancer. **J Am Coll Surg**, v.200, p.371–377, 2005.
- HOLST, P.A.; PHEMISTER, R.D. The prenatal development of dog: preimplantation events. **Biology of reproduction**, Madison, v.5, n.2, p.194-206, 1971.
- HOWE, L.M. Surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**, v.66, p.500-509, 2006.
- JACKSON, L.W. et al. Oxidative stress and endometriosis. **Hum Reprod**, v.20, p.2014–2020, 2005.
- JEDSADAYANMATA, A. et al. Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.274, n.34, p.24321-7, 1999.
- JEFFCOATE, I.A. Concentrations of luteinizing hormone and oestradiol un plasma and response to injection of gonadotrophin releasing hormone at different stages of



- anoestrous in domestic bitches. **Journal of reproduction and fertility**. v.94, p.423-429, 1992.
- JEFFCOATE, I.A. Endocrinology of anoestrus bitches. **Journal of reproduction and fertility supplement**, v.47, p.69-76, 1993.
- JEFFCOATE, I.A. Physiology and endocrinology of the bitch. In: **Manual of small animal reproduction and neonatology**. Cheltenham:BSAVA, p.1-9, 1998.
- JOHNSON C.A. Chapter 125: Cystic Endometrial Hyperplasia, Pyometra, and Infertility. In: ETTINGER S.J., FELDMAN E.C. (ed): **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 4ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p.1636-1642, 1995.
- JOHNSTON, S.D. et al. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia, Pensilvânia. Saunders. 592p. 2001.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**; 6 ed., cap. 25, p.1186-1188, 2007.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica. Texto e Atlas**. Ed. Guanabara Koogan, 11a Ed., 542p., 2008.
- KIREEVA M.L. et al. Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development. **Exp Cell Res**, v.233, p.63–77, 1997.
- KIREEVA, M.L. et al. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. **Molecular and Cellular Biology**, Whashington, v.16, n.4, p.1326-34, 1996.
- KOLESNIKOVA T.V., LAU L.F. Human CYR61-mediated enhancement of bFGF-induced DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells. **Oncogene**, v.16, p.747–754, 1998.
- KOOISTRA, H.S. et al. Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in Beagle bitch. **Biology of Reproduction**, Madison, v.60, n.1, p.65-71, 1999.

- KOOISTRA, H.S.; OKKENS, A.C.; Role of changes in the pulsatile secretion pattern of FSH in initiation of ovarian folliculogenesis in bitches. **Journal of reproduction and fertility supplement**, v.57, p.11-14, 2001.
- KUNZ, M. et al. Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. **J Biol Chem**, v.278, p.45651–45660, 2003.
- LAU, L.F.; NATHANS, D. Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.84, p.1182±1186, 1987.
- LEE, H.Y. *et al.* Forkhead transcription factor FOXO3a is a negative regulator of angiogenic immediate early gene CYR61, leading to inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. **Circ Res**. v.100, p.372-380, 2007.
- LUNDEEN, S.G. et al. Differential display PCR analysis of gene expression in eutopic and ectopic endometrial tissue (abstract No. 27). Presented at the **VII World Congress on Endometriosis**, London, May, 2000.
- MACKAY, R.J. Inflammation in horses. **Veterinary Clinical North America Equine Practice**. v.16, n.1, p.15-27, 2000.
- MACLAUGHLAN, S.D. et al. Endometrial expression of CYR61: a marker of estrogenic activity in normal and abnormal endometrium. **Obstetrics & Gynecology**, v.110, p.146-154. 2007.
- MARTINERIE C. et al. Chromosomal mapping and expression of the human cyr61 gene in tumour cells from the nervous system. **Mol Pathol**. v.50, p.310–316, 1997.
- MARTINS, D.G. **Complexo hiperplasia endometrial cística/piometra em cadelas: fisiopatogenia, características clínicas, laboratoriais e abordagem terapêutica**. Tese de dissertação de mestrado apresentada. 2007.
- MARTINS, L.R. et al. Correlação entre a ocorrência de piometra em cadelas nulíparas e múltiparas submetidas ou não ao tratamento com anticoncepcionais. In: **Mostra de iniciação científica**, 6ed., 2002, Botucatu. Anais. Botucatu: UNESP, 2002.

- MATSUZAKI, S. et al. Angiogenesis in endometriosis. **Gynecol Obstet Invest**, v.46, p.111–115, 1998.
- MATSUZAKI, S. et al. Immunohistochemical analysis of the role of angiogenic status in the vasculature of peritoneal endometriosis. **Fertil Steril**, v.76, p.712–716, 2001.
- MCBRIDE, W.M. et al. Ovarian function and FSH receptor characteristics during canine anoestrus. **Journal of reproduction and fertility supplement**, v.57, p.3-10, 2001.
- MEMON, M.; MICKELSEN, D. Diagnosis and Treatment of Closed-Cervix Pyometra in a Bitch. **JAVMA**, vol.203, n.4, p.509-512, 1993.
- MENENDEZ J.A.; MEHMI I.; GRIGGS D.W.; LUPU R. International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer: the angiogenic factor CYR61 in breast cancer: molecular pathology and therapeutic perspectives. **Endocr Relat Cancer**, v.10, p.141–152, 2003.
- MIALOT, J.P. Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos. **A Hora Vet**, v.4, p.17-27, 1984.
- MONTEIRO, C.M.R. et al. Histologia e morfometria em cornos uterinos de cadelas nulíparas, múltíparas e tratadas com contraceptivos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.29, n.10, p.847-851, 2009.
- MORAIS, R.N. Função testicular e adrenocortical em machos de pequenos felinos monitorada através de esteróides fecais. Apostila. **Curso de Extensão – Felinos Selvagens – Biotécnicas Reprodutivas e Conservação**. UFPR, Curitiba – PR, 1998.
- NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2ed. Rio de Janeiro, 137p., 2003.
- NAUS, C.C. et al. Identification of genes differentially expressed in C6 glioma cells transfected with connexin43. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v.32, n.1, p.259-66, 2000.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Distúrbios reprodutivos. In: **Fundamentos de medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, cap.10, p.496-521, 1998.

NISKANEM, M.; THRUSFIELD, M.V. Association between age, parity, hormonal therapy and breed and pyometra in finnish dogs. **Vet Rec**, v.143, n.18, p.493- 498, 1998.

NOAKES, D.E.; DHALIWAL, G.K.; ENGLAND, G.C.W. Cystic endometrial hyperplasia/piometra in dogs: a review of the causes and pathogenesis. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. 57, 395 – 406, 2001.

Nomura, K. Induction of a deciduoma in the dog. **J Vet Med Sci**, v.56, p.:365–369, 1994.

NOMURA, K.; NISHIDA, A. Histological variations of canine deciduoma induced in non pregnant horn at different stages of unilateral pregnancy. **J Vet Med Sci** v.60, p.623–626, 1998.

O'BRIEN, T.P. et al. Expression of Cyr61, a growth factor- inducible immediate-early gene. **Molecular and Cellular Biology**, Whashington, v.10, p.3569-3577, 1990.

O'BRIEN, T.P.; LAU, L.F. Expression of the growth factor-inducible immediate early gene cyr61 correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. **Cell Growth & Differentiation**, Philadelphia, v.3, n.9, p.645-54, 1992.

OHLSON, A. **Sjukdomstillstånd associerade med monocytos hos svenska hundaren retrospektiv journalstudie**, Doctor's dissertation, University of Agricultural Sciences Uppsala, Sweeden, 2005.

OKANO, S.; TAGAWA, M; TAKASE, K. Relationship of the blood endotoxin concentration and prognosis in dogs with pyometra. **J Vet Med Sci**, v.60, n.11, p. 1265 – 1267, 1998.

OLIVEIRA, K.S. et al. CYR61, a cellular proliferation marker in dogs with prostatic disease. **Theriogenology**, v.66, n.6-7, p.1618-1620, 2006.

OLIVEIRA, K.S. **Mecanismo de transdução de sinal na próstata de cão: avaliação nas vias da p-ERK1/2 e da CYR61**. 130f. Tese (Doutor em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Reprodução Animal, 2009.

OLIVEIRA, R.P.M., OLIVEIRA, F.F. **Manipulação do ciclo estral em ovinos**. PUBVET, v.2, n.7, 2008. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=146>>. Acesso em: 20/06/08

OLIVEIRA, S.R. **Detecção de Haemophilus parasuis por meio da técnica de imunoperoxidase em suínos experimentalmente infectados**. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de veterinária da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

OLSON, P.N. et al. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. **Biology of reproduction**, v.27, p.1196-1206, 1982.

OLSON, P.N.; NETT, T.M. Reproductive endocrinology and physiology of the bitch. In: MORROW, D. A (Ed). **Currenty therapy in theriogenology**. 2ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p.453-457, 1986.

OLSON, P.N. et al. Vaginal cytology. Part I. A useful tool for staging the canine estrous cycle. **Comp Cont Educ**. v.6, n.4, p.288-297, 1984.

PALHANO, H.B. et al. Reprodução em bovinos: Fisiopatologia, Terapêutica, Manejo e Biotecnologia. Porto Alegre: **A Hora Veterinária**, 160p., 2003.

PANCIERA, D.L.; RITCHLEY, J.W.; WARD, D.L. Endotoxin-induced nonthyroidal illness in dogs. **Am J Vet Res**, v. 64, p.229-234, 2003.

PENDURTHI, U.R. et al. Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. **J Biol Chem**, v.275, n.19, p.14632-41, 2000.

PERBAL, B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. **Lancet**, v.363, p.62–64, 2004.

- PERBAL, B. NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. **Mol Pathol**, v.54, p.57-79, 2001.
- PERBAL, B.; BRIGSTOCK, D.R.; LAU, L.F. Report on the second international workshop on the CCN family of genes. **Mol Pathol**. v.56, p.80–85, 2003.
- PILARSKY, C.P. et al. Expression of the extracellular matrix signaling molecule Cyr61 is downregulated in prostate cancer. **Prostate**. Jul 1, v.36, n.2, p.85-91, 1998.
- PINHO, M.S.L. Imunoistoquímica: O Estudo da Biologia Molecular ao Alcance de Todos. **Rev bras Coloproct**, v.25, n.2, p.188-191, 2005.
- PLANQUE, N.; PERBAL, B. A structural approach to the role of CCN (CYR61/CTGF/NOV) proteins in tumorigenesis. **Cancer Cell Int**. v.3, p.15, 2003.
- PRATT, M.A.; SATKUNARATNAM, A.; NOVOSAD, D.M. Estrogen activates raf-1 kinase and induces expression of Egr-1 in MCF-7 breast cancer cells. **Mol Cell Biochem**, v.189, p.119-125, 1998.
- PURVIS, D.; KIRBY, R. Systemic inflammatory response syndrome: septic shock. **Veterinary Clinical North America Small Animal Practice**. v.24, n.6, p.1225-1247, 1994.
- RACHFAL, A.W.; BRIGSTOCK, D.R. Structural and functional properties of CCN proteins. **Vitam Horm**, v.70, p.69–103, 2005.
- RHO, S.B. et al. Cysteine-rich 61 (CYR61) inhibits cisplatin-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. **Biotechnol Lett**, v.31, p.23-28, 2009.
- RIVERA-GONZALEZ, R. et al. Estrogen-induced genes in the uterus of ovariectomized rats and their regulation by droloxifene and tamoxifen. **Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, Oxford, v.64, n.1-2, p.13-24, 1998.
- ROOT KUSTRITZ, M.V. Use of commercial luteinizing hormone and progesterone assay kits in canine breeding management. *In*: Concannon, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J. (Eds.), “**Recent Advances in Small Animal Reproduction**”, International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Ithaca, New York, USA, 2001.

ROOT KUSTRITZ, M.V. Cystic endometrial hyperplasia and pyometra, In: ETTINGER, S.J. & FELDMAN, E.C., editors, **Textbook of veterinary internal medicine**, 6th ed., St. Louis: Elsevier Saunders, p.1676-1680, 2005.

SAMPATH, D.; WINNEKER, R.C.; ZHANG, Z. Cyr61, a member of the CCN family, is required for MCF-7 cell proliferation: regulation by 17 $\beta$ -estradiol and overexpression in human breast cancer. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.142, n.6, p.2540-8, 2001a.

SAMPATH, D. et al. Aberrant expression of the CYR61, a member of the CCN (CTGF/Cyr61/Cef10/NOVH) Family, and dysregulation by 17 $\beta$ -estradiol and basic fibroblast growth factor in human uterine leiomyomas. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.86, p.1707- 1715, 2001b.

SAKAMOTO, S. et al. Development of quantitative detection assays for CYR61 as a new marker for benign prostatic hyperplasia. **Journal Biomolecular Screening**, v.8, n.6, p.701-11, 2003.

SAKAMOTO, S. et al. Increased expression of CYR61, an extracellular matrix signaling protein, in human benign prostatic hyperplasia and its regulation by lysophosphatidic acid. **Endocrinology**, Chevy Chase v.145, n.6, p.2929-40, 2004.

SAKAMOTO, S. et al. Induction and Function of CYR61 (CCN1) in Prostatic Stromal and Epithelial Cells: CYR61 is Required for Prostatic Cell Proliferation, **Prostate**, v.61, p. 305–317, 2004b.

SCHOBBER, J.M. et al. Identification of integrin\_M\_2 as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. **Blood**, v.99, p.4457–4465, 2002.

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; NOLTE, I. Untersuchungen zur Pathogenese des Endometritis-Pyometra-Komplexes der Hundin, **J Vet Med A**, v.39, p.43-56, 1992.

SCHUTZE, N. et al. The human analog of murine cystein rich protein 61 [correction of 16] is a 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: regulation by cytokines, growth factors, and serum. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.139, n.4, p.1761-70, 1998.

SHARKEY, A.M. et al. Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. **J Clin Endocrinol Metab**, v.85, p.402–409, 2000.

SILVA, L.D.M. **Procréation médicalement assistée dans l'espèce canine. Investigations morpho-fonctionnelles et optimisation des techniques permettant d'arriver à la maîtrise de la reproduction.** 173f. Tese (Docteur en Sciences Vétérinaires) – Université de Liège, Faculté de médecine Vétérinaire, Section de petits Animaux, Liège, 1995.

SIMMONS, D.L. et al. Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.86, n.4, p.1178-82, 1989.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais.** São Paulo: Manole, Ed.3, p.1545–1549, 2007.

SOKOLOWSKI, J.H. Reproductive patterns in the bitch. **Vet Clin North Am**, v.7, p.653-666, 1977.

STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L.E. Processos Reprodutivos na Fêmea. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. Dukes: **Fisiologia dos Animais Domésticos.** 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.615-633, 1996.

STABENFELDT, G.H.; SHILLE, V.M. Reproduction in the dog and cat. In: COLE, H.H.; CUPPS, P.T. (Ed.). **Reproduction in domestic animals.** 3ed. Nova Iorque: Academic Press, p.499-527, 1977.

STANISLAUS, D. et al. Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotrophin-releasing hormone. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.144, n.1, p.1-10, 1998.

STONE, E.A. Pyometra, In: SLATTER, D.H., editor, **Textbook of small animal surgery**, 3rd ed., Philadelphia: Saunders, p.1489-1493, 2003.

SWANSON, W.F.; WILDT, D.E. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. **Int Zoo Yb.** v.5, p.152-159, 1997.

TABIBZADEH, S.; BECKER, J.L.; PARSONS, A.K. Endometriosis is associated with alterations in the relative abundance of proteins and IL-10 in the peritoneal



- fluid. **Front Biosci**, v.8, p.70–78, 2003.
- TAMURA, I.; ROSENBLOOM, J.; MACARAK, E.; CHAQOUR, B. Regulation of Cyr61 gene expression by mechanical stretch through multiple signaling pathways. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.281, n.5, p.1524-1532, 2001.
- TAN, X.J. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis. **Fertil Steril**, v.78, p.148–153, 2002.
- TANJA, P.; BARBARA, C.; KRISTINA, D. et al. Haemostasis impairment in bitches with pyometra, **Acta Vet Beograd**, v.56, n5-6, p.529-540, 2006.
- TAYLOR, R.N.; LUNDEEN, S.G.; GIUDICE, L.C. Emerging role of genomics in endometriosis research. **Fertil Steril**, v.78, p.694-698, 2002.
- TOLOSA, E.M.C.; BEHMER, O.A.; FREITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Barueri – SP: Manole, 331p, 2003.
- TONG, X. et al. Cyr61, a Member of CCN Family, Is a Tumor Suppressor in Non-Small Cell Lung Cancer. **J Biol Chem**, v.276, p.47709–47714, 2001.
- TONG, X. et al. Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the beta-catenin-c-myc-p53 pathway. **Oncogene**, v.23, p.4847–4855, 2004.
- TONIOLLO, G.H.; FARIA, D. Jr.; LEGA, E.; BATISTA, C.M.; NUNES, N. Piometra na espécie felina – Relato de caso em Panthera onça. **Braz. J Vet Res Amin Sci**, v.37, n.2, São Paulo, 2000.
- TSAI, M.S. et al. Cyr61 promotes breast tumorigenesis and cancer progression. **Oncogene**. 21, 8178–8185, 2002.
- TSAI, M.S. et al. Expression and function of CYR61, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies. **Cancer Res**, v.60, p.5603-5607, 2000.
- TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, suppl.39, p.269-275, 1989.
- UEMURA, H.; MIZOKAMI, A.; CHANG, C. Identification of a new enhancer in the promoter region of human TR3 orphan receptor gene. A member of steroid receptor superfamily. **J Biol Chem**, v.270, p.5427-5433, 1995.

- VADEN, S.L.; LEVINE, J.F; CORREA, M.T. Retrospective analysis of 106 dogs with acute renal failure. **J Vet intern Med**, v.9, p.209, 1995.
- VALTONEN, M.; JALKANEN, L. Species-specific features of oestrus development and blastogenesis in domestic canine species. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, suppl.39, p.133-137, 1993
- van der LINDEN, P.J. et al. Expression of cadherins and integrins in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Fertil Steril**, v.63, p.1210–1216, 1995.
- VANNUCCHI, C.I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S.C. Técnica de citologia vaginal como método diagnóstico da fase do ciclo estral em cadelas. **Clin Vet** , v.2, n.9, p.14-19, 1997.
- VALOCZKY, I.; CSÝCSAY, G.; MARACEK, I. Use of anamnesis and clinical signs in decision-making regarding treatment of bitches with cystic endometrial hyperplasia and pyometra complex, **Hungar Vet J**, v.120, p.474-478, 1998.
- VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G. Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch; Advances in treatment and assessment of future reproductive success. **Theriog**, v.70, p.364-374, 2008.
- VOORWALD, F.A. et al. Pesquisa de bactérias e sensibilidade aos antimicrobianos em conteúdo intra-uterino de fêmeas caninas com piometra. **Anais do XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Porto de Galinhas, 2009.
- XIE, D. et al. Breast cancer. Cyr61 is overexpressed, estrogen-inducible, and associated with more advanced disease. **J Biol Chem**, v.276, p.14187–14194, 2001a.
- XIE, D. et al. Elevated Levels of Connective Tissue Growth Factor, WISP-1, and CYR61 in Primary Breast Cancers Associated with More Advanced Features. **Cancer Res**. v. 61, p.8917–8923, 2001b.

XIE, D et al. Cyr61 Is Overexpressed in Gliomas and Involved in Integrin-Linked Kinase-Mediated Akt and  $\beta$ -Catenin-TCF/Lef Signaling Pathways. **Cancer Res.** v.64, p.1987–1996, 2004.

WEISS, R.R.; CALOMENO, M.A.; SOUSA, R.S. et al. Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela. **Arch. Vet. Sci.**, v.9, p.81-87, 2004.

WU, K.J. et al. Characterization of differential gene expression in monkey arterial neointima following balloon catheter injury. **Int J Mol Med**, v.6, p.433–440, 2000.

YANG, G.P.; LAU, L.F. Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. **Cell Growth & Differentiation**, Philadelphia, v. 2, n.7, p.351-7, 1991.

ZEITOUN, K. et al. Deficient 17 $\beta$ hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17 $\beta$ -estradiol. **J Clin Endocrinol Metab**, v.83, p.4474–4480, 1998.