

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE
PLACENTAS CANINAS PROVENIENTES DE EUTOCIA E DISTOCIA**

ISADORA FRAZON COSTA

BOTUCATU-SP
Agosto - 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE
PLACENTAS CANINAS PROVENIENTES DE EUTOCIA E DISTOCIA

ISADORA FRAZON COSTA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal (Área de concentração: Reprodução Animal), como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Adjunto Nereu Carlos Prestes

BOTUCATU-SP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Costa, Isadora Frazon.

Análise morfológica e imunohistoquímica de placentas caninas provenientes de eutocia e distocia / Isadora Frazon Costa. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Nereu Carlos Prestes

Coorientador: Maria Denise Lopes

Capes: 50501054

1. Neonatologia veterinária. 2. Animais domésticos - Reprodução. 3. Cão - Morfologia. 4. Placenta - Pesquisa. 5. Imuno-histoquímica. 6. Distocia. 7. Receptores de Progesterona.

Palavras-chave: análise histológica; hematoma marginal; labirinto placentário; receptor de estrógeno; receptor de progesterona.

Nome da Autora: Isadora Frazon Costa

Título: ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE PLACENTAS
CANINAS PROVENIENTES DE EUTOCIA E DISTOCIA

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Titular Maria Denise Lopes

Presidente e Coorientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Dra. Carla Fredrichsen Moya-Araujo

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profª. Ass. Dra. Maria Dalva Cesário

Membro

Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências

IB - UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 7 de agosto de 2015

DEDICATÓRIA

É com a imensidão do meu amor que dedico este trabalho aos meus pais Isidoro e Angela, seres humanos iluminados, com os quais aprendo diariamente lições de honestidade, caráter e acima de tudo o verdadeiro sentido da vida: AMAR.

*Plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.
E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito
mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e
que você tem valor diante da vida!*

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Obrigada *DEUS*, por iluminar meus caminhos, pelo aprendizado, por me conceder o dom da vida!

Aos meu pais Isidoro e Angela, o que tenho de mais precioso em minha vida é o amor de vocês, meu porto seguro, meus companheiros de todas as horas, meus maiores incentivadores, a vocês devo tudo que sou, a vocês devo a minha vida, *AMO VOCÊS INFINITAMENTE!!*

Ao meu querido orientador professor Dr. Nereu Carlos Prestes, palavras não serão o bastante para demonstrar a admiração e carinho que tenho pelo senhor, obrigada pelo incentivo, pela paciência e acima de tudo pelos ensinamentos da profissão (*muitos...*). Conhecê-lo foi um privilégio, de todo coração: Muito Obrigada!!!

As minhas queridas irmãs Fernanda (Tata), Mariana e Amanda, por nossa união, nossas risadas, pelo incentivo, por serem tão especiais em minha vida e por todo amor a mim dedicado, "*amo vocês*".

Em especial, a minha irmã Mariana, excelente Médica Veterinária e dona do coração mais puro que já conheci. Grande responsável por minha conquista, seu companheirismo, caráter, ética profissional são espelhos em minha vida. Obrigada pela paciência pelos dias (*dias e dias...*) em que não estive presente em nossa clínica para me dedicar a realização deste trabalho.

Ao meus sobrinhos amados, Gabriel e Alice, minha fonte de alegria, pureza e descontração, *a tia Isa ama vocês!!*

Ao meu namorado, Vinícius (*V*), o que seria de mim sem ele (...pra me ensinar formatação de texto e a fazer os gráficos e planilhas do exel!!!) obrigada por todos estes anos de amor e carinho e por fazer parte da minha vida. Amo você!!

Ao meu cunhado Juliano, meu irmão de coração, pelo carinho e incentivo e que para minha sorte é o professor Dr. Juliano Milanezi de Almeida da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Unesp), que ao lado do Professor Titular *Valdir* Gouveia Garcia, abriu as portas de seu laboratório para minha pesquisa, agradeço pelo empréstimo dos equipamentos que tanto contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu cunhado Fábio, meu irmão de coração, pelo carinho e incentivo, pela ajuda com as fotos, com a impressão e por ser especial em minha vida.

À querida professora Maria Cecília Rui Luvizotto, que aprendi a admirar pela humildade, inteligência, competência e é claro pelo bom humor. Obrigada professora

por abrir as portas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba até em finais de semana para me passar seu conhecimento com tanta dedicação e carinho, não há como agradecer toda atenção. Seus ensinamentos fazem diferença em minha vida profissional, Muito obrigada!!

À professora Dra. Maria Denise Lopes, pelo incentivo, ajuda nos momentos de dificuldade e por ceder gentilmente a alíquota do anticorpo de progesterona para a realização deste trabalho.

À minha querida amiga professora do Curso de Zootecnia Instituto Federal Goiano, Dra. Aline Sousa Camargos, a grande incentivadora para meu ingresso no mestrado, obrigada pelo carinho e amizade.

À todos os professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo aprendizado, em especial as professoras Dra. Eunice Oba e Dra. Fabiana Ferreira de Souza pela contribuição na realização deste trabalho.

À professora Dra. Renée Laufer Amorim, pelo apoio com toda infra-estrutura e materiais necessários para a análise imunohistoquímica e pelo incentivo na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de imunohistoquímica, pelo convívio e ensinamentos.

Ao professor Dr. Carlos Roberto Padovani, pela análise estatística.

À minha amiga Gabriela Gomes Elias, pelo incentivo, companheirismo e ajuda com a revisão gramatical.

Ao meu amigo José Renato Laino Martinelli Cury pela ajuda e incentivo.

À minha amiga Josiane Lourenção pelo companheirismo e ajuda.

Ao técnico da patologia José Carlos Pedroso de Lima, pelo excelente serviço prestado com o processamento histológico das placentas e por ser prestativo nos momentos que precisei.

Aos Funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, em especial a Dona Raquel pela simpatia com que sempre se dirigiu a mim.

Aos colegas pós-graduandos pelo convívio, troca de experiências e auxílio nas horas que precisei.

As funcionárias da Clínica Veterinária Saúde Animal, pelo convívio, amizade e grande ajuda na coleta das placentas.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu em especial ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pós-graduandos.

Aos *animais*, criaturas divinas, o verdadeiro motivo deste trabalho é o amor que carrego por vocês!

À Fapesp, pelo auxílio pesquisa concedido que viabilizou a execução deste projeto.

Aos meus cães, fiéis companheiros, Pirata, Diana e Zeus, pelo amor incondicional de todos estes anos, minhas queridas Zuri e Megh, amarei vocês sempre!!

À todos aqueles que nesta jornada, contribuíram de alguma forma para meu crescimento pessoal e profissional.

Muito Obrigada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das áreas de hemorragia no labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina	22
Tabela 2 - Distribuição das áreas de necrose no labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina	23
Tabela 3 - Distribuição das áreas de inflamação no labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina	23
Tabela 4 - Distribuição das áreas de calcificação no labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina	24
Tabela 5 - Distribuição das áreas de integridade do hematoma marginal segundo os grupos experimentais da espécie canina	24
Tabela 6 - Distribuição da expressão para vimentina nas células do labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina	27
Tabela 7 - Distribuição da expressão para citoqueratina nas células do labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina	28
Tabela 8 - Distribuição da expressão para progesterona nas células do labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Macroscopia da face fetal das placentas dos três grupos experimentais (a) placenta GN, (b) placenta GC, (c) placenta GAUP. Fonte: Arquivo Pessoal	16
Figura 2 - Placenta de cadela GN (a) face fetal, irrigação da cinta placentária que emerge do cordão umbilical, hematomas marginais localizados em suas extremidades, (b) face materna, aspecto esponjoso devido área de interação com o endométrio. Fonte: Arquivo Pessoal	17
Figura 3 - Fotomicrografia panorâmica de placenta de cadela proveniente de parto normal, HE 10x (a) região do hematoma marginal, intensa coloração avermelhada devido a presença de eritrócitos, (b) zona glandular, presença das glândulas endometriais distendidas devido sua função secretora, (c) zona lamelar, arranjo de lamelas e dobras com presença de células sinciciotrofoblásticas, (d) zona juncional, presença das glândulas endometriais e início das projeções lamelares, (e) face fetal, aparente transição da zona lamelar para o mesênquima fetal, HE 20x. Fonte: Arquivo Pessoal	20
Figura 4 - Fotomicrografia de placenta de cadela (a) GN - necrose coagulativa observada em toda a extensão da face epitelial materna (N), HE 20x, (b) GN - perda da integridade com aparente calcificação do endotélio vascular do labirinto placentário (↓), HE 40x, (c) GN - região lamelar, células sinciciotrofoblásticas (S), citotrofoblásticas (C), e vasos sanguíneos com presença de hemácias íntegras (H), HE 40x, (d) GN - aspecto do alantoamnion, HE 20x, no detalhe amniócitos, dos quais emergem protrusões citoplasmáticas (↓), HE 40x, (e) GN - hematoma marginal, presença de cristais de hematóidina (↓), HE 20x, (f) GN - células trofoblásticas próximas as regiões dos hematomas marginais realizando eritrofagocitose (T), HE 40x, (g-h) GC - zona lamelar, na morfologia, aspectos similares as placentas GN, e na região média da zona lamelar, áreas notadamente coincidentes com as alterações das placentas GAUP, HE 40x, (i) GAUP - zona lamelar, perda da integridade morfológica das hemácias no interior dos vasos (*) aparente dilatação do leito vascular (V), lamelas com aspecto frouxo devido a rarefação das células trofoblásticas, HE 40x. Fonte: Arquivo Pessoal	21

- Figura 5** - Fotomicrografia de placenta de cadela (a) GAUP - região de interface com epitélio materno apresentando área de hemorragia (*), HE 20x, (b) GC - zona lamelar evidenciando múltiplos focos de necrose (*), HE 20x, (c) GAUP - zona lamelar com infiltrado inflamatório difuso acentuado (↓), HE 20x; (d) GC - zona lamelar mostrando áreas multifocais de calcificação (↓), HE 20x, (e) GN - hematoma marginal, acúmulo de eritrócitos, HE 20x, (f) GAUP - hematoma marginal, dissolução parcial dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, presença de malhas de fibrina, sugerindo a formação do coágulo sanguíneo, HE 20x. Fonte: Arquivo Pessoal 25
- Figura 6** - Fotomicrografia de placenta de cadela (a) GN - zona lamelar, intensa e homogênea imunomarcção para vimentina, Hematoxilina de Mayer 40x. (b) GC - face materna, zona glandular, imunomarcção para citoqueratina nas glândulas endometriais, Hematoxilina de Mayer 40x. Fonte: Arquivo Pessoal 27
- Figura 7** - Fotomicrografia da zona lamelar de placenta de cadela (a) GN - imunomarcção nuclear intensa para progesterona, Hematoxilina de Mayer 40x, (b) GAUP - imunomarcção para progesterona, intensidade fraca, Hematoxilina de Mayer 40x, (c) GAUP - ausência de imunomarcção para progesterona, Hematoxilina de Mayer 40x, (d) GN - ausência de imunomarcção para estrógeno α , Hematoxilina de Mayer 20x. Fonte: Arquivo Pessoal 30

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

α - alfa
 β - beta
cm - centímetros
cod - código
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
DAB - diaminobenzidine
g - gramas
°C - grau Celcius
GAUP - grupo placentas obtidas de atonia uterina primária
GC - grupo placentas obtidas de cesariana
GN - grupo placentas obtidas de parto normal
HE - hematoxilina e eosina
IV - intravenoso
LH - hormônio luteinizante
> - maior
 $\pm$ - mais ou menos
® - marca registrada
< - menor
 μ m - micrometros
mg - miligramas
mL - mililitros
mM - milimolar
n° - número
PBS - phosphate buffered saline
PCR - reação em cadeia da polimerase
% - porcentagem
pH - potencial hidrogeniônico
PGF2 α - prostaglandina F2 α
Kg - quilograma
RE α - receptor de estrógeno alfa
RE β - receptor de estrógeno beta
REPAS - Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres
RP - receptor de progesterona
RNAm - ácido ribonucléico mensageiro
REs - receptores de estrógeno
SP - São Paulo
TRIS - Trizma Base
UI - unidades internacionais
UNESP - Universidade Estadual Paulista
USA - United States of America
W - wats

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 <i>Placentação na espécie canina</i>	2
2.2 <i>Morfologia da cinta placentária na cadela</i>	4
2.3 <i>Progesterona e estrógeno: hormônios da gestação e parto na espécie canina</i>	7
2.4 <i>Fisiologia do parto na cadela</i>	8
3. OBJETIVOS	11
3.1 <i>Objetivos específicos</i>	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 <i>Aspectos éticos</i>	11
4.2 <i>Animais e grupos experimentais</i>	11
4.3 <i>Análise macroscópica</i>	12
4.4 <i>Análise histológica</i>	12
4.5 <i>Localização imunohistoquímica para vimentina e citoqueratina</i>	13
4.6 <i>Localização imunohistoquímica para progesterona e estrógeno α</i>	14
4.7 <i>Análise estatística</i>	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1 <i>Análise macroscópica</i>	16
5.2 <i>Análise histológica</i>	17
5.3 <i>Localização imunohistoquímica para vimentina e citoqueratina</i>	26
5.4 <i>Localização imunohistoquímica para progesterona e estrógeno α</i>	28
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
Trabalho a ser enviado para a Revista Brasileira de Reprodução Animal ...	38
ANEXOS	49

COSTA, I.F. **Análise morfológica e imunohistoquímica de placentas caninas provenientes de eutocia e distocia.** Botucatu, 2015. 58p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A placentação e o desenvolvimento das membranas fetais na espécie canina atualmente são estudados de forma extensiva, já que o conhecimento da morfologia da placenta possibilita reconhecer corretamente alterações patológicas e sua possível correlação com a viabilidade neonatal. O presente estudo tem como objetivo a caracterização morfológica e imunohistoquímica de placentas de cadelas provenientes de eutocia e distocia. Para o desenvolvimento deste experimento foram coletadas 80 placentas, de acordo com o tipo de parto as placentas foram divididas em três grupos experimentais, GN (n=40) placentas obtidas de parto normal, GC (n=28) placentas obtidas de cesariana e GAUP (n=12) placentas obtidas de cadelas em atonia uterina primária. Fragmentos 1cm x 1cm foram seccionados da região próxima ao cordão umbilical e armazenados em formol tamponado 10% durante 48 horas, a seguir, foram transferidos para álcool 70%, no qual permaneceram até o processamento para o estudo histopatológico e imunohistoquímico. Foram reconhecidas áreas de hemorragia, necrose, inflamação e calcificação nas placentas dos três grupos estudados. A hemorragia no parênquima placentário foi identificada em todos os grupos experimentais, não apresentando diferença significativa. A necrose evidenciada junto a face materna foi uma constante nos grupos avaliados, entretanto foram observados na região lamelar focos e áreas de necrose no GC e GAUP, porém estes achados não foram estatisticamente relevantes quanto a comparação ao GN. A inflamação foi raramente observada no GN, esteve pouco presente no GC e predominou nas amostras placentárias do GAUP. Os focos de calcificação identificados foram mais notórios no GC e GAUP. Nos grupos estudados foram observadas alterações discretas quanto a integridade histológica dos hematomas marginais. Nas placentas GN a imunomarcagem para vimentina mostrou-se intensa e homogênea em toda zona lamelar, fato não ocorrido nas placentas GC e GAUP, que apresentaram a imunomarcagem caracterizada pela variação da intensidade. Para citoqueratina não houve diferença na análise da imunomarcagem dos três grupos experimentais. A expressão de RP nas placentas GN e GC foi intensa, já GAUP demonstrou expressão fraca ou ausência de expressão. Nas condições em que este trabalho foi realizado utilizando a técnica de imunohistoquímica, não foi possível a detecção de RE α nas placentas dos três grupos experimentais. Conclui-se que as alterações morfológicas encontradas nas placentas provenientes de eutocia e distocia, embora nunca antes mencionadas em literatura, podem ser consideradas como achados fisiológicos para a placenta da espécie em estudo. A expressão de receptores para progesterona em placentas provenientes de atonia uterina é fraca ou ausente quando comparada a intensa expressão encontrada nas placentas provenientes de parto normal e cesárea. Placentas caninas a termo podem não expressar receptores para estrógeno α .

Palavras-chave: labirinto placentário, hematoma marginal, análise histológica, vimentina, citoqueratina, receptor de progesterona, receptor de estrógeno.

COSTA, I.F. **Morphological and immunohistochemical analysis of canine placentas from eutocia and dystocia.** Botucatu, 2015. 58p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Placentation and the development of fetal membranes in dogs are currently studied extensively, since the knowledge of morphology of the placenta enables properly recognize pathological changes and its correlation with neonatal viability. We aimed to characterize morphologically and immunohistochemically placentas of bitches from eutocia and dystocia. For that 80 placentas were collected and classified according to the type of delivery into three experimental groups, GN (n = 40) placentas obtained from normal delivery, GC (n = 28) placentas obtained from cesarean section and GAUP (n = 12) placentas obtained from bitches with uterine atony. 1cm x 1cm pieces were cut from the region near the umbilical cord and stored in 10% buffered formalin for 48 hours following, were transferred to 70% alcohol, which remained until processing for histopathological and immunohistochemical study. In this research, areas of hemorrhage, necrosis, inflammation and calcification were observed in the placentas in all three groups. Hemorrhagic areas were identified in the placental parenchyma in all groups, without significant difference. The evident necrosis in the placenta maternal face was constant in the groups, we observe areas and spots of necrosis in the lamellar region in GC and GAUP, but those findings were not statistically significant when compared to GN. Inflammation was rarely observed in the GN and it was observed in a few samples in the GC, however it was predominant in samples from GAUP. Calcification spots were observed in GC and GAUP. In the studied groups, discrete alterations were observed when histological integrity of marginal hematomas was evaluated. In GN the immunostaining for vimentin proved to be intense and homogeneous throughout lamellar zone, however this was not observed in GC and GAUP, which presented immunostaining characterized by variation of intensity. For cytokeratin there was no difference between experimental groups. The RP expression in GN and GC was intense, but GAUP samples had weak or absent expression. In the conditions in which this work was carried out using the immunohistochemical technique, we could not detect RE α in placentas in all three experimental groups. We conclude that most of morphological changes observed in placentas from bitches in eutocia or dystocia, although never before mentioned in literature, can be considered as physiological findings. The expression of progesterone receptors in placentas from bitches in uterine atony is weak or absent when compared to the intense expression found in placentas from normal and cesarean delivery. Estrogen α receptors expression wasn't observed in this study.

Keywords: placental labyrinth, marginal hematoma, histological analysis, vimentin, cytokeratin, progesterone receptor, estrogen receptor.

1. INTRODUÇÃO

A indústria *pet* brasileira ocupa o segundo lugar absoluto no mercado mundial. O número de cães no país chega a 52,2 milhões, equivalente a 1,8 cachorro por domicílio (IBGE, 2014). Inicialmente as pesquisas pertinentes à reprodução animal, eram direcionadas aos animais de produção, com a evolução do vínculo entre o cão e o homem, os estudos relacionados a esta espécie tornaram-se mais relevantes (ARALLA et al., 2013).

A placentação e o desenvolvimento das membranas fetais na espécie canina atualmente são estudados de forma extensiva, já que o conhecimento da morfologia placentária possibilita reconhecer corretamente suas alterações patológicas e a possível correlação com a viabilidade neonatal (MIGLINO et al., 2006; ARALLA et al., 2013).

As cadelas possuem particularidades reprodutivas quando comparadas a outras espécies domésticas, são monoéstricas não sazonais, ciclos estrais separados por um intervalo que varia de 4 a 9 meses e a gestação se desenvolve por um período de 65 ± 1 dias após o pico de LH (CONCANNON, 1977; BANKS, 1992; LUZ, 2004).

A placenta é uma estrutura complexa, formada a partir da união das membranas fetais com o endométrio. Existente somente nos mamíferos, é considerada um órgão de transição presente apenas no período gestacional, tendo por função a ligação entre a mãe e feto para promover suprimento de oxigênio e nutrientes, remoção de detritos metabólicos, produção e secreção de hormônios, fatores de crescimento fetal e regulação do ambiente uterino do feto (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Na cadela, esta é classificada como endoteliocorial, pois apenas o endotélio separa o sangue materno do tecido fetal, já que durante o período de implantação o epitélio e o tecido conjuntivo desaparecem (BANKS, 1992). Como zonária, com base na localização central dos embriões e por possuir uma faixa onde as vilosidades coriônicas se agrupam semelhante a uma cinta, também considerada do tipo invasiva, visto que o trofoblasto dos embriões contém sinciciotrofoblasto, que interfere no estabelecimento das conexões com o sangue materno e deciduada, pois há perda de tecido materno no parto (HAFEZ; HAFEZ, 2004; LACROIX, 2004; FURUKAWA et al., 2014).

Sabe-se que a placenta tem capacidade de produzir e secretar hormônios, além de possuir receptores hormonais. Os principais hormônios reguladores da função e crescimento do trato reprodutivo da fêmea são a progesterona e o estrógeno cuja ação é mediada pela interação específica com seus receptores intracelulares, entretanto, a presença destes receptores na placenta canina ainda não está bem estabelecida (VEIGA et al., 2009; ITHURRALDE et al., 2013).

Diante do exposto, propõe-se aprimorar o entendimento acerca das estruturas e funções placentárias, para tanto, objetiva-se com o presente estudo a caracterização morfológica e imunohistoquímica de placentas caninas provenientes de eutocia e distocia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Placentação na espécie canina

O processo de placentação é caracterizado pela formação e união das membranas fetais ao endométrio, tendo início após o período de implantação do embrião no útero, havendo crescimento externo do mesoderma extra-embriônico a partir do trofoblasto e posterior migração entre o trofoectoderma e endoderma (DELLMANN, 1982; HAFEZ; HAFEZ, 2004; PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

De acordo com Hyttel et al. (2012) na cadela a placentação tem início entre o 14º e 18º dia de gestação. Nesta espécie a descrição do evento da placentação desperta interesse em muitos autores, já que há uma específica realizada por Leiser e Koob (1993) e Miglino et al. (2006) para o gato doméstico.

Embora a placenta em todos os mamíferos tenha sempre as mesmas funções e sua constituição básica seja o endométrio e as membranas fetais, existem diferenças entre as espécies que determinam os vários tipos de classificações, que incluem o grau de implantação no endométrio, a distribuição do contato, as membranas extra-embriônicas, configuração da conexão coriônica, combinação dos tecidos maternos e fetais e o desenvolvimento inicial do trofoblasto (BANKS, 1992; HYTTEL et al., 2012). Segundo Furukawa et al. (2014), a melhor forma para realizar a descrição dos diferentes tipos de placentação é basear-se em sua composição histológica, de acordo com este sistema os três tipos principais são: epiteliocorial (equinos, suínos e ruminantes), endoteliocorial (carnívoros) e hemocorial (primatas, roedores).

A placenta é composta por vários elementos teciduais, porém as estruturas consideradas funcionalmente mais importantes são o sangue em circulação e o trofoblasto (DELLMANN, 1982). O sangue materno e fetal não entram em contato direto, mas são muito próximos na região da união do córion com o endométrio para a passagem de nutrientes e gases, na cadela o fluxo sanguíneo placentário é caracterizado como corrente cruzada (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O trofoblasto é essencial durante a vida uterina, pois desempenha papel na ancoragem do embrião no útero, realiza trocas metabólicas e gasosas, nutre, promove defesa contra patógenos,

confere proteção contra o sistema imune materno, entretanto é expelido durante o parto como parte da placenta (HYTTEL et al., 2012).

A placenta cresce rapidamente e modifica de tamanho, formato e estrutura interna ao longo do período gestacional (DELLMANN, 1982). Com o desenvolvimento embrionário o trofoblasto funde-se com a membrana interna de células da mesoderme, originando o córion, que envolve externamente todo o embrião e as outras membranas fetais: o âmnion, o saco vitelino e o alantóide, que constituem os anexos embrionários (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

O âmnion é a membrana fetal que menos se modifica nos mamíferos, é composto por duas camadas celulares, o epiblasto derivado da camada ectodérmica e mesoderma embrionário não vascular, esta membrana confere ao conceito proteção mecânica, permite o crescimento fetal e proteção contra adesão. O saco vitelino tem origem endodérmica, sendo responsável pela nutrição inicial do embrião. Já o alantóide, de origem endodérmica, é responsável pela hematopoiese inicial e de seus vasos sanguíneos se originam os vasos umbilicais (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006; HYTTEL et al., 2012).

Em síntese, a estrutura histológica dos anexos embrionários não difere muito de uma membrana epitelial que reveste, protege, secreta e absorve, pois também está apoiada troficamente a um tecido conjuntivo vascularizado que lhe permite ampla difusão (WOODING; FLINT, 1994).

Na espécie canina, amostras uterinas coletadas antecedendo o 10º dia de gestação não apresentam qualquer evidência de estrutura placentária. Nesta fase o blastocisto é desprovido de zona pelúcida e flutua livre pelo lúmen uterino, que apresenta epitélio típico de diestro, exibindo células epiteliais colunares altamente vacuolizadas (MIGLINO et al., 2006; ARALLA et al., 2013).

Conforme descrito por Aralla et al. (2013), o saco vitelino na fase inicial da gestação é fino e composto por duas camadas, sendo o epitélio plano de origem endodérmica e uma camada de vasos sanguíneos primitivos, o âmnio apresenta-se composto por duplo epitélio desprovido de vascularização, já o alantóide não é distinto nesta fase.

No 14º dia gestacional é expressiva a penetração do trofoblasto no epitélio endometrial, iniciando a formação do labirinto placentário, o âmnion totalmente fechado com pequena quantidade de líquido translúcido reveste o embrião, o alantóide mostra-se presente, a cinta placentária inicia sua formação, o epitélio alantoideano e o córion invadem o endométrio em diversos pontos, dando origem as vilosidades primárias (ENDERS; CARTER, 2012; ARALLA et al., 2013).

Aproximadamente no 20º dia de gestação o saco vitelino está completamente vascularizado, sendo estes vasos sanguíneos originados do cordão umbilical e se apresenta proeminente em relação ao tamanho do embrião. Os hematomas marginais começam ser evidentes a partir do 22º ao 25º dia de gestação, visivelmente marcados como faixas verdes nas extremidades da cinta placentária, provenientes do extravasamento de sangue dos capilares maternos (MIGLINO et al., 2006).

De acordo com Miglino et al. (2006), até o 45º dia de gestação há um grande desenvolvimento do alantóide, já o âmnio permanece pouco vascularizado. No terço final da gestação o feto está quase completamente desenvolvido dentro do âmnio e totalmente envolvido pelo alantóide, a cinta placentária ganha sua morfologia completa e o saco vitelino é uma fina camada de tecido conjuntivo (ARALLA et al., 2013).

A placenta garante a nutrição do feto durante seu desenvolvimento, realiza funções que substituem seus pulmões, rins, sistema gastrointestinal, glândulas endócrinas e fígado. Separa o organismo materno do fetal e favorece o transporte de gases (oxigênio e dióxido de carbono) e nutrientes (açúcares, vitaminas, minerais e aminoácidos), além de eliminar produtos de metabolismo fetal no sangue materno e produzir hormônios responsáveis pela adaptação do organismo materno nas diferentes fases do período gestacional (HAFEZ; HAFEZ, 2004; BROLIO et al., 2010).

2.2 Morfologia da cinta placentária na cadela

A morfologia da placenta entre as espécies de mamíferos está sujeita a maior variação individual do que qualquer outro órgão com importância semelhante (DELLMANN, 1982).

Segundo Ambrósio et al. (2004), macroscopicamente a cinta placentária da cadela apresenta sua parte média levemente escavada, mostrando-se com aspecto esponjoso, apresenta coloração vermelho escuro com faixa marginal milimétrica de coloração esverdeada devido a presença dos hematomas placentários.

A placenta canina é irrigada por dois ramos arteriais do cordão umbilical, um destinado ao labirinto placentário denominado ramo placentário central, e ramo placentário coriônico responsável pela irrigação dos hematomas marginais (AMBRÓSIO et al., 2009).

Composta por uma parte fetal e outra uterina, a cinta placentária é formada a partir da penetração do sinciciotrofoblasto no estroma uterino, o epitélio endometrial e o tecido conjuntivo sofrem processo degenerativo e são fagocitados, caracterizando a aproximação entre

o trofoblasto e os vasos endometriais, que estabelece uma relação do tipo endoteliocorial (HYTTEL et al., 2012).

A organização dos tecidos maternos e fetais na cinta placentária ocorre sob forma de lamelas. A lamela materna é estabelecida pelo estroma endometrial e o endotélio dos vasos maternos, já a lamela fetal, por dupla camada de trofoblasto, o sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto. Ao decorrer do desenvolvimento placentário estas lamelas demonstram um aspecto labiríntico, denotando esta região como labirinto placentário (LEISER; KOOB, 1993).

A região do labirinto placentário desempenha papel de extrema importância nas trocas fisiológicas entre mãe e feto. Histologicamente esta região é composta por zonas distintas: zona glandular: onde estão presentes projeções das glândulas endometriais; zona juncional: fusão dos tecidos maternos e fetais, contendo a parte terminal da zona lamelar, *debris* celular, vasos maternos e secreções glandulares; zona lamelar: caracterizada pela presença das células citotrofoblásticas e sinciciotrofoblásticas; e os hematomas marginais: localizados às margens da cinta placentária, formados pela degeneração do endotélio materno (DELLMANN, 1982; LEISER; KOOB, 1993; ARALLA et al., 2013).

A zona glandular é composta por restos das glândulas endometriais, que por possuírem função secretora tornam-se distendidas como resultado de sua obstrução devido a penetração no trofoblasto. Durante a gestação, com o aumento progressivo da zona lamelar a zona juncional desloca-se em direção ao organismo materno, diminuindo significativamente a espessura da zona glandular (LEISER; KOOB, 1993; FURUKAWA et al., 2014).

A zona juncional é caracterizada como área de transição entre a zona glandular e lamelar, sendo a região de inserção das lamelas maternas delimitando a intrusão do trofoblasto no estroma endometrial, onde encontra-se ainda regiões de glândulas uterinas e células decíduais (DELLMANN, 1982; LEISER; KOOB, 1993). A camada mais profunda da zona juncional é, particularmente na cadela, chamada de camada esponjosa sendo a partir dela, que no parto, a placenta se separa do endométrio (FURUKAWA et al., 2014).

As células decíduais são células do estroma do tecido conjuntivo materno que tem formato arredondado ou poliédrico e podem ser mono ou binucleadas. Nos animais domésticos, são encontradas apenas na cadela e na gata e sua exata função ainda é desconhecida. Pode ter desde função nutritiva, de proteger a mucosa uterina contra a invasão trofoblástica, formar gonadotrofinas placentárias, até delinear zona de clivagem no momento do parto, e estão presentes ocasionalmente nas cadelas exibindo filamentos intermediários de vimentina. (DELLMANN, 1982; BANKS 1992; VERMEIRSCH et al., 2000; MINAZAKI et al., 2008).

Histologicamente a zona lamelar desenvolve-se a partir de projeções coriônicas e endometriais, dando origem a um complexo arranjo de lamelas e dobras de tecido fetal e materno. Na cadela as lamelas são ramificadas e possuem aparência tubular. A parte fetal é composta de lamelas de trofoblasto e mesênquima, que contém pequenos capilares de parede delgada, já na porção materna capilares relativamente largos circundados pelo trofoblasto. O trofoblasto origina duas diferentes populações celulares, células mais discretas, o citotrofoblasto que está localizado basalmente e a fusão de células trofoblásticas, denominadas sinciotrofoblasto, que estão localizadas mais superficialmente (DELLMANN, 1982; LEISER; KOOB, 1993; HYTTEL et al., 2012).

O sinciotrofoblasto é altamente invasivo e destrói o epitélio endometrial e o tecido conjuntivo para aproximar o trofoblasto do endotélio materno. Já o citotrofoblasto torna-se descontínuo a medida em que a gestação progride. Estas células estão dispersas ao longo das áreas mesenquimatosas das lamelas (DELLMANN, 1982; MINAZAKI et al., 2008; HYTTEL et al., 2012).

Uma característica da placenta canina é a presença dos hematomas nas margens da cinta placentária, estas estruturas começam a ser evidentes a partir do 22º ao 25º dia de gestação e resultam da degeneração de parte do endotélio materno invadido e rompido pelo sinciotrofoblasto. São considerados lagos sanguíneos que se depositam entre a camada epitelial uterina e o trofoblasto, que nesta região é caracterizado como colunar e apresenta sinais de fagocitose. Devido a presença dos hematomas marginais a membrana corioalantóidea desenvolve vilos que entram diretamente em contato com os vasos maternos (DELLMANN, 1982; MIGLINO et al., 2006; AMBRÓSIO et al., 2009).

Os hematomas marginais facilitam a absorção de ferro para o feto através da eritrofagocitose, o trofoblasto que reveste esta região realiza a digestão de eritrócitos no interior de seus lisossomos e, durante o processo de degradação da hemoglobina, há liberação de ferro férrico e formação de uma substância de coloração esverdeada, a uteroverdina, que é convertida em bilirrubina no fígado e excretada. Porém, em algumas placentas há acúmulo de bilirrubina originando cristais de hematóidina (DELLMANN, 1982; LUZ, 2004; AMBRÓSIO et al., 2009; ENDERS; CARTER, 2012).

Muitos mamíferos (morcegos, musaranhos, preguiças) possuem placenta endoteliocorial sem a presença dos hematomas marginais, na maioria destas espécies não se sabe qual a forma de obtenção de ferro por parte do feto (ENDERS; CARTER, 2012).

2.3 Progesterona e estrógeno: hormônios da gestação e parto na espécie canina

A liberação e o equilíbrio entre diferentes hormônios são responsáveis pela manutenção e progressão da gestação (progesterona, estrógeno, relaxina e prolactina), bem como para o desencadeamento do trabalho de parto (progesterona, estrógeno e ocitocina), entretanto, a redução na proporção progesterona/estrógeno é o evento mais importante na gestação, pois resulta na dilatação da cérvix, no descolamento placentário e no aumento da contratilidade uterina (CONCANNON et al., 1977; VEIGA et al., 2009).

A placenta é altamente vascularizada e participa da regulação do intercâmbio endócrino entre mãe e feto, sendo responsável por produzir a maior variedade de hormônios do que qualquer outro órgão. Na espécie canina, a placenta não possui capacidade de produzir hormônios esteróides, assim, como a progesterona e o estrógeno, porém, tal fato não impede que o tecido placentário possua receptores para ambos hormônios (BANKS, 1992; VEIGA et al., 2009).

A progesterona é vital à manutenção da prenhez, sobretudo, em virtude de sua capacidade de inibir as contrações uterinas, mediar a contratilidade da cérvix e aumentar as secreções das glândulas endometriais. Sua fonte principal após o início da gestação varia de acordo com a espécie, entre o corpo lúteo e a placenta. Na cadela a progesterona necessária à manutenção da gestação é a produzida pelo corpo lúteo, parte desta progesterona passa para a circulação materna e outra parte é captada pelo feto servindo como substrato para a síntese de corticóides fetais (HAFEZ; HAFEZ, 2004; REECE, 2007; HENRÍQUEZ et al., 2012).

Segundo Marinelli et al. (2008), na cadela a síntese de progesterona pode sofrer influência do peso corpóreo e da idade, em seu estudo foi evidenciado que cadelas com idade superior a 2 anos e meio, pesando mais de 20Kg possuem maior número de corpos lúteos eficientes em produzir progesterona quando comparadas com cadelas mais jovens e com menor peso corpóreo. Em média a concentração de progesterona sérica durante a prenhez varia de 10 a 50 ng/mL, valores que tendem a diminuir de 3ng/ml a menos de 1ng/ml durante as 24 horas que antecedem o parto (NELSON; COUTO, 2010).

Conforme descrito por Henríquez et al. (2012), a progesterona integra a formação das células decíduais no útero materno, cuja função é vital para a nutrição do embrião no início do período gestacional. Kowalewski et al. (2010) mencionaram as células decíduais como a única célula da placenta canina capaz de expressar receptores de progesterona (RP).

O estrógeno desempenha papel vital no parto, aumentando a sensibilidade para ocitocina, afim de promover contrações uterinas e favorecer a dilatação do colo uterino. Fundamental para

a correta liberação dos envoltórios fetais, o estrógeno é encontrado em quantidades muito baixas em animais que apresentam retenção de placenta, além de exercer efeito proliferativo nos tecidos maternos, como por exemplo aumento do útero, glândulas mamárias e genitais externos (NISHIYAMA et al., 1999; HENRÍQUEZ et al., 2012).

Os receptores de estrógeno (RE) dividem-se em dois subtipos, receptores alfa (RE α) e receptores beta (RE β), que são transcritos por diferentes genes. Apesar de poderem estar presente em vários tecidos e células estrógeno-sensíveis, a expressão dos receptores de estrógeno (REs) varia durante a proliferação e diferenciação celular (JONES; FOX, 1978). Ambos são expressos no endométrio e miométrio durante a gestação, nos folículos ovarianos, corpo lúteo e no estroma mamário (MOWA; IWANAGA, 2000; PELLERIER; EL ALFY, 2000; VEIGA, 2008).

O estrógeno é sintetizado na placenta de humanos e animais, entretanto, não há síntese deste hormônio na placenta de cães, ratos e coelhos, fato atribuído ao curto período gestacional nestas espécies. Em contrapartida, seres humanos, primatas, ruminantes e equinos são capazes de produzir estrógeno placentário por apresentarem longo período gestacional (NISHIYAMA et al., 1999).

A expressão de RP e de RE α estão significativamente correlacionadas (VEIGA et al., 2009), de acordo com Wu et al. (1993) estes receptores foram observados nas células decíduais de placentas de primatas e humanos. Segundo Vermeirsch et al. (2000) RP e RE α estão presentes apenas na porção materna da placenta canina, acarretando na possível não regulação direta da função placentária por ambos hormônios.

2.4 Fisiologia do parto na cadela

O parto pode ser considerado fisiologicamente, como uma liberação de efeitos inibitórios no útero e o recrutamento de fatores que promovem a atividade uterina. Os fatores responsáveis pela inércia uterina durante a prenhez incluem a relaxina e a progesterona, entretanto, a queda abrupta desse hormônio é um pré-requisito para o início do parto. Já a atividade uterina nesta fase é consequência da ação da prostaglandina e da ocitocina (PRESTES, 2001; NELSON; COUTO, 2010).

As concentrações de prolactina aumentam no período pré-parto, ao mesmo tempo em que ocorre diminuição das concentrações plasmáticas da progesterona (CONCANNON et al., 1977; FELDMAN; NELSON, 2004).

As cadelas, próximas ao parto, apresentam alta concentração de 13,14-dihidro-ceto-prostaglandina F2 na circulação sanguínea, demonstrando com isso a participação da PGF2 α na luteólise pré-parto desta espécie e no mecanismo de contração do miométrio (CONCANNON et al., 1977).

A placenta normalmente é liberada de 5 a 15 minutos após o nascimento de cada neonato. Algumas cadelas, principalmente aquelas que já passaram por vários partos, rompem o âmnion e cordão umbilical, realizando a higiene total do filhote, e exibem o comportamento de ingerir a placenta, com isso, podem apresentar êmese (LUZ, 2004; PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

À medida que transcorre o descolamento das placentas, há liberação de uteroverdina decorrente da metabolização da biliverdina presente nos hematomas marginais. A secreção persiste de 3 a 4 semanas pós-parto e, em condições normais, deve ser sempre inodora (LUZ, 2004).

Conforme sua evolução o parto pode ser definido como normal ou distócico, quando ocorre de forma natural ou quando necessita de intervenção manipulativa, medicamentosa ou cirúrgica, respectivamente (NELSON; COUTO, 2010).

O parto normal se divide em três fases: prodrômica, dilatação e expulsão do feto (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006; NELSON; COUTO, 2010).

Na fase prodrômica, com duração média de 6 a 12 horas, ocorrem mudanças morfofuncionais que permitem a percepção da proximidade do parto, tais como: inquietação, anorexia e início da conduta materna, buscando a solidão e construindo ninho para abrigar os filhotes, comportamento derivado da elevação da prolactina (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006; NELSON; COUTO, 2010). Nesta fase, interessante salientar que há um declínio da temperatura corpórea de 0,5 a 1,0°C nas 12 a 24 horas antecedentes ao parto, devido a ausência do efeito termogênico da progesterona. Também há dilatação cervical, mas ainda não existem sinais externos de contração uterina ou abdominal (CONCANNON et al., 1977; NELSON; COUTO, 2010).

Durante a fase de dilatação, que dura em média de 3 a 6 horas e vai desde o início das contrações uterinas até a ruptura das membranas fetais, ocorre o relaxamento da musculatura lisa da vagina, do útero e da cérvix, insinuando as bolsas fetais e mantendo as contrações, com a completa dilatação da porção mole da via fetal (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006; NELSON; COUTO, 2010).

A fase de expulsão dos fetos, persiste desde a ruptura dos envoltórios fetais até o nascimento completo com estímulo para que a musculatura abdominal se contraia, dura entre 3 a 12 horas, e pode se estender até 24 horas, dependendo do número de filhotes e de partos anteriores (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Conforme o feto passa pela via fetal mole, ocorre o ‘Reflexo de Ferguson’ estímulo que desencadeia um reflexo neuroendócrino, levando a liberação de ocitocina, responsáveis pelo aumento das contrações uterinas involuntárias, à medida que o feto passa pelo canal do parto ocorre à ruptura do corioalantoide e o filhote aparece na abertura vulvar, normalmente envolto pelo âmnion. Em geral o parto normal na espécie canina pode se completar em um período de 6 a 48 horas (LUZ, 2004).

É comum em cadelas a ocorrência de distocia (podendo variar de 5% a 100%), definida como a incapacidade em iniciar o parto no momento correto, ou quando há problema na expulsão normal dos fetos, uma vez que o parto tenha iniciado (JUTKOWITZ, 2005; LINDE-FORSBERG, 2005; SMITH-CARR, 2005; KUTZLER, 2009). Para que seja possível determinar a ocorrência de uma distocia, é necessário o conhecimento dos eventos que acontecem durante a gestação e parto normais (LINDE-FORSBERG, 2005; JOHNSON, 2008).

A distocia pode ter origem materna ou fetal, considerando falha nos mecanismos de forças expulsivas e canal pélvico ou problemas com o posicionamento e tamanho dos fetos respectivamente (BOJRAB, 1983). De acordo com Walett-Darvelid e Linde-Forsberg (1994), 75% das distocias em cadelas são de origem materna e 25% de origem fetal.

Dependendo da gravidade e da causa a intervenção nas distocias pode ser realizada de diferentes maneiras, manobras obstétricas podem ser adotadas para a correção do posicionamento ou estática fetal (LÚCIO, 2008; NELSON; COUTO, 2010).

A indução das contrações uterinas por meio de agentes ecbólicos, tem indicação quando há hipotonia ou atonia uterina. A ocitocina é o agente mais utilizado, porém, seu uso é contra indicado nos casos em que não há dilatação cervical, outros efeitos citados para os agentes ecbólicos são de reduzir a hemorragia pós-parto, impedir a retenção das membranas fetais e facilitar a involução uterina. Simultaneamente à ocitocina nos casos de inércia uterina, pode-se utilizar o gluconato de cálcio. Nos casos de distocia em que não podem ser realizadas as intervenções citadas, o procedimento adotado deverá ser a cesariana (LÚCIO, 2008).

3. OBJETIVOS

Neste estudo, pretende-se a caracterização morfológica e imunohistoquímica de placentas caninas provenientes de eutocia e distocia.

3.1 Objetivos específicos

- Reconhecer possíveis variações na macroscopia de placentas em face à eutocia e distocia.
- Identificar e caracterizar morfológicamente as regiões do labirinto placentário e hematomas marginais de placentas caninas provenientes de parto normal, cesariana e atonia uterina primária.
- Analisar possível alteração da organização histológica na região do labirinto placentário, bem como a integridade das áreas de hematomas marginais das placentas dos grupos experimentais.
- Verificar a expressão para vimentina e citoqueratina nas estruturas das placentas de cada grupo.
- Avaliar a imunolocalização de receptores para progesterona e estrógeno α na placenta e sua possível correlação em casos de distocia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais do presente estudo foram conduzidos respeitando as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação em Animais do Campus de Botucatu, UNESP (Protocolo nº129/2013-CEUA).

4.2 Animais e grupos experimentais

As placentas utilizadas no presente estudo foram coletadas simultaneamente no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu-SP e na Clínica Veterinária Saúde Animal, localizada no município de Manduri-SP.

Para o desenvolvimento deste estudo foram coletadas 80 placentas, provenientes de 25 cadelas, com e sem raça definida, idade entre 2 e 10 anos, com peso médio 20Kg, primíparas e múltiparas, fecundadas por monta natural, previamente submetidas a exame clínico para confirmação da hígidez. Foram colhidas em média, 3 placentas de cada fêmea.

De acordo com a necessidade apresentada individualmente pelas cadelas, a coleta das placentas ocorreu a partir de parto normal, cesariana, seguindo a técnica cirúrgica padrão, cujo procedimento foi realizado em sala cirúrgica com devidos cuidados assépticos, sob a condução de profissionais regulamentados, ou nos casos de atonia uterina primária, utilizando fármacos indutores do parto, sendo o protocolo utilizado: ocitocina 1UI/kg por via subcutânea, gluconato de cálcio 50mg/kg por via intravenosa (IV) e glicose 0,5g/kg/IV/hora.

Conforme o tipo de parto as placentas foram divididas em três grupos experimentais, GN (n=40) placentas obtidas de parto normal, GC (n=28) placentas obtidas de cesariana e GAUP (n=12) placentas oriundas de cadelas em atonia uterina primária.

Após o parto o cordão umbilical foi seccionado adequadamente. Cada neonato foi classificado (vivo, morto e natimorto e sexo) e identificado numericamente à sua placenta. O conjunto de anexos fetais foi encaminhado ao laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS), sendo isolada somente a porção zonária da placenta. Posteriormente fragmentos 1cm x 1cm foram seccionados da região próxima ao cordão umbilical e armazenados em formol tamponado 10% durante 48 horas. A seguir, foram transferidos para o álcool 70%, no qual permaneceram até o processamento para o estudo histopatológico e imunohistoquímico.

4.3 Análise macroscópica

No momento da coleta a cinta placentária foi avaliada quanto ao seu aspecto e coloração, os índices de normalidade foram caracterizados segundo descrito por Ambrósio (2004).

4.4 Análise histológica

Para a realização da análise histológica os fragmentos placentários de 1cm x 1cm foram inclusos em parafina na orientação transversal. Após a inclusão, foram obtidos cortes de 3µm, montados em lâminas com extremidade fosca e corados com hematoxilina e eosina (HE).

A análise histológica visou caracterizar morfológicamente as regiões do labirinto placentário, a integridade hematomas marginais e identificar alterações morfológicas entre as placentas dos três grupos experimentais. Os achados foram graduados quanto sua intensidade em escala de 0 a 3, sendo 0 - ausente, 1 - discreto, 2 - moderado e 3 - acentuado.

4.5 Localização imunohistoquímica para vimentina e citoqueratina

Os fragmetos parafinizados foram seccionados em cortes de 3µm de espessura e colocados em lâminas silanizadas Starfrost®.

Para a desparafinização, as lâminas foram mantidas em estufa a 55°C por uma hora. Em seguida, foram colocadas em cuba de vidro, à temperatura ambiente para passagens sucessivas em xilol I, II e III por 10 minutos cada. A hidratação do material foi realizada em banhos de álcool, permanecendo por 5 minutos em cada cuba (álcool absoluto I, II, III, álcool 90%, 80%, 70% e 50%). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos.

Para a revelação antigênica as lâminas foram encubadas em solução de citrato de sódio 10mM, pH 6,0 corrigido com hidróxido de sódio, no microondas, potência 100W, durante 15 minutos.

A inibição das peroxidases endógenas foi realizada em solução de peróxido de hidrogênio a 5% por 30 minutos, em ambiente com ausência de luz. Posteriormente, em solução de 20% de peróxido de hidrogênio em metanol (950mL de metanol e 50mL de peróxido de hidrogênio 20 volumes) por mais 30 minutos, as lâminas foram submetidas a lavagem com PBS pH 7,2-7,4 durante 10 minutos.

Para o bloqueio das ligações inespecíficas foi utilizado leite em pó Molico® a 6% (6g de leite em 100mL de água destilada) por 30 minutos, seguidas de lavagem com PBS pH 7,2-7,4 por 10 minutos. A etapa seguinte realizada foi a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:400 para vimentina (Monoclonal Mouse anti-Swine Vimentin - Clone V9 cod:M0725 Dako®) e 1:300 para citoqueratina (Monoclonal Mouse anti-human Cytokeratin - Clone AE1/AE3 cod:M3515 Dako®) em câmara úmida, durante 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente durante 18 horas, à 4°C.

Como controle positivo foi utilizado corte histológico de pele de cão e para controle negativo a lâmina contendo tecido placentário foi incubada omitindo o anticorpo primário.

Após 18 horas de incubação com o anticorpo primário em câmara úmida a 4°C, o material foi submetido a três lavagens com PBS pH 7,2-7,4, sendo 10 minutos cada lavagem; em seguida houve incubação por 10 minutos em temperatura ambiente utilizando o reagente

complemento (Reveal Complement - cod. DCMT - 999, Biogen®). Como etapa seguinte foi realizada a incubação com o reagente conjugado HRP (Reveal HRP Conjugate - cod. DHRR - 999 Biogen®) em temperatura ambiente durante 15 minutos e ao término deste período as lâminas foram submetidas a 4 lavagens com PBS pH 7,2-7,4, sendo 10 minutos cada lavagem.

Após, foi realizada a revelação com o cromógeno DAB (DAB Substrate System BGDAB-999- Biogen®), durante 5 minutos em temperatura ambiente e novamente lavagem com PBS pH 7,2-7,4 durante 10 minutos.

Os cortes histológicos foram contracolorados com hematoxilina de Mayer por 30 segundos, e a coloração interrompida com lavagem em água corrente por 10 minutos.

Iniciada a etapa de montagem, o material foi desidratado com banhos de álcool e xilol. As lâminas permaneceram 5 minutos em cada cuba (álcool 50%, álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, álcool absoluto I, II, III, álcool/xilol, xilol I, II e III), por fim foram montadas com lamínulas utilizando-se resina sintética (Permount, Fisher Scientific®) e avaliadas em microscopia óptica quanto a distribuição da imunomarcação de acordo com a descrição de Hewitt et al., (2011), para marcação citoplasmática, em que, 0: ausência de coloração, 1: coloração fraca em menos de 50% das células, 2: coloração forte em menos de 50% das células ou coloração fraca em mais de 50% das células e 3: coloração forte em mais de 50% das células.

4.6 Localização imunohistoquímica para progesterona e estrógeno α

Os fragmetos parafinizados foram seccionados em cortes de 3 μ m de espessura e colocados em lâminas silanizadas Starfrost®.

Para a desparafinização, as lâminas foram mantidas em estufa a 55°C por 24 horas. Em sequência, foram colocadas em cuba de vidro com xilol à temperatura ambiente por 30 minutos, posteriormente, em nova solução de xilol por 20 minutos. As lâminas foram transferidas para a hidratação em banhos de álcool, permanecendo por 3 minutos em cada cuba (álcool absoluto I, II, III, álcool 95% e álcool 85%). Após, as lâminas foram submetidas a 10 passagens de água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada em solução de citrato de sódio 10mM, pH 6,0 corrigido com hidróxido de sódio, com incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako, USA).

A etapa seguinte foi o bloqueio das peroxidases endógenas em solução de peróxido de hidrogênio a 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, em seguida bloqueio das

ligações inespecíficas com leite em pó Molico® 3g/100mL por 60 minutos, 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base®– Sigma ChemicalCo, USA).

A próxima etapa realizada foi a incubação com o anticorpo primário na diluição de 1:50 para progesterona e estrógeno α (anticorpo monoclonal cat. n° 1546, Immunotech, France e anticorpo Monoclonal Mouse Anti- Human Estrogen Receptor α clone 1D5 - Dako – CA, USA, Cód M7047, respectivamente) em câmara úmida, durante 18 horas, à 4°C.

Para ambos receptores, os controles positivos utilizados foram cortes histológicos de endométrio canino com hiperplasia endometrial cística e glândula mamária canina com presença de células tumorais, já para controle negativo a lâmina contendo tecido placentário foi incubada omitindo o anticorpo primário.

Após 18 horas de incubação com o anticorpo primário em câmara úmida a 4°C, as lâminas foram submetidas a banhos de TRIS e, posteriormente, à incubação com o anticorpo secundário Histofine® (polímero hrp - Nichirei Bioscience cod. 414154f) por 30 minutos em estufa a 27°C e ao término desta etapa nova lavagem com solução tampão TRIS - pH 7,4 e revelação com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina - Liquid DAB Cromogen® – Dako, USA), durante 5 minutos, e novamente lavagem com solução tampão TRIS - pH 7,4.

Os cortes histológicos foram contracolorados com hematoxilina de Mayer por 2 minutos, e a coloração interrompida com lavagem em água corrente por 10 minutos e 5 passagens em água destilada. Foi realizada a desidratação do material com banhos de álcool, as lâminas permaneceram 3 minutos em cada cuba (álcool 85%, álcool 95%, álcool absoluto I, II, III, xilol I e II), por fim, foram montadas com lamínulas utilizando-se resina sintética (Permount, Fisher Scientific®) e avaliadas em microscopia óptica quanto a intensidade da imunomarcagem de acordo com a descrição de Hewitt et al. (2011), para marcação nuclear, em que, 0: ausência de coloração, 1: coloração fraca em menos de 50% das células, 2: coloração forte em menos de 50% das células ou coloração fraca em mais de 50% das células e 3: coloração forte em mais de 50% das células.

4.7 Análise estatística

Para a associação das variáveis referentes as alterações morfológicas, integridade das regiões dos hematomas marginais, imunomarcagem para vimentina, citoqueratina, progesterona e estrógeno α nos tecidos placentários dos grupos experimentais, foi utilizado teste de Goodman,

complementado com as comparações múltiplas entre e dentro de populações multinomiais, a nível de 5% de significância (GOODMAN, 1964 e 1965).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Análise macroscópica*

A análise macroscópica das placentas estudadas não demonstrou diferença significativa.

As regiões do labirinto placentário e hematomas marginais puderam ser distintos, o labirinto apresentou coloração vermelho escuro com aspecto esponjoso e em suas extremidades, nos hematomas marginais, notou-se região esverdeada nos três grupos, reforçando os achados de Ambrósio et al. (2009) (Figura 1).

Nas placentas do GC os hematomas marginais estavam mais evidentes, chamando a atenção para a maior impregnação de uteroverdina (Figura 1b).

Ambrósio et al. (2009) citaram que as regiões dos hematomas marginais até o 46° dia de gestação excedem o tamanho da cinta placentária, porém, após este período o desenvolvimento da cinta placentária se sobressai e assim se mantêm até o momento do parto. Todas as placentas avaliadas neste experimento apresentaram a cinta placentária proporcionalmente maior do que as regiões dos hematomas marginais fortalecendo a literatura citada.

Na face fetal, o labirinto placentário se mostrou ricamente vascularizado, o ramo placentário central responsável pela irrigação desta região emergiu do cordão umbilical (Figura 2a). A face materna exibiu aspecto esponjoso (Figura 2b) devido a área de interação com o endométrio, corroborando com Ambrósio et al. (2009).



Figura 1- Macroscopia da face fetal das placentas dos três grupos experimentais (a) placenta GN, (b) placenta GC, (c) placenta GAUP. Fonte: Arquivo Pessoal.

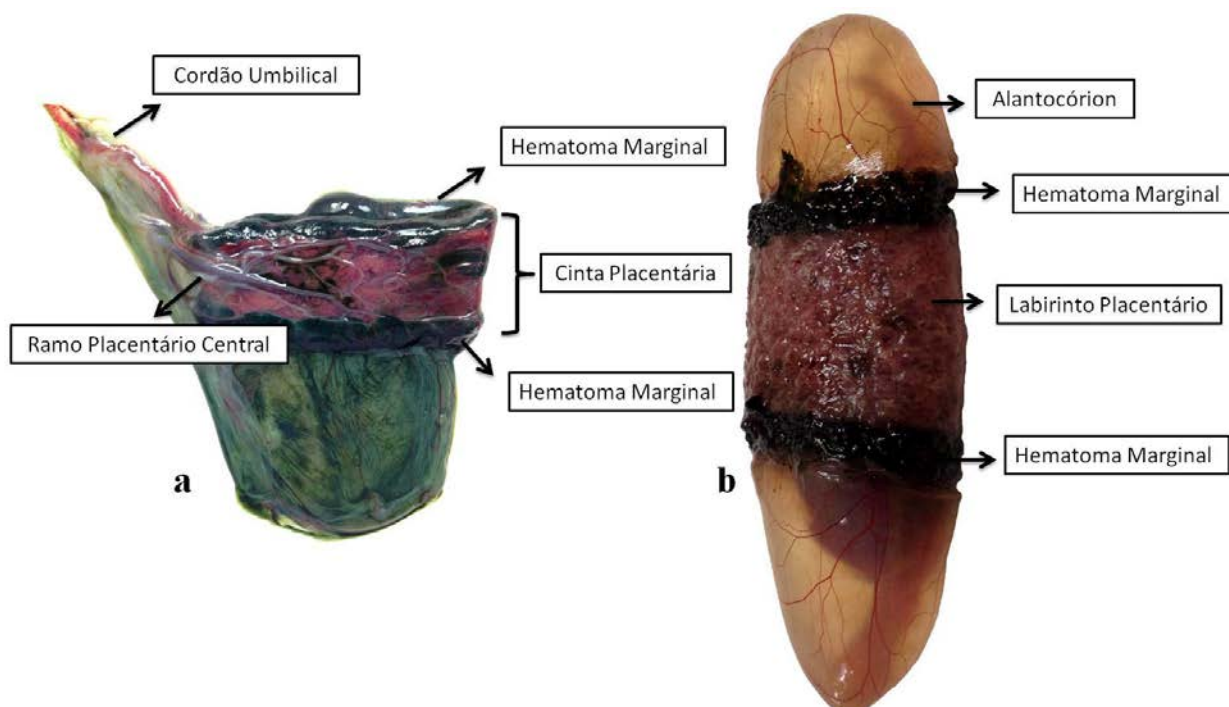


Figura 2 - Placenta de cadela GN (a) face fetal, irrigação da cinta placentária que emerge do cordão umbilical, hematomas marginais localizados em suas extremidades, (b) face materna, aspecto esponjoso devido área de interação com o endométrio. Fonte: Arquivo Pessoal.

5.2 Análise histológica

Neste estudo foram analisados 80 cortes histológicos corados com HE referentes as placentas provenientes dos três grupos experimentais (GN:n=40; GC:n=28; GAUP:n=12).

Foi possível caracterizar as regiões dos hematomas marginais como aglomerado de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, provenientes da degeneração do endotélio de vasos maternos, dados que fortalecem os achados de Ambrósio et al. (2009) (Figura 3a).

Na região do labirinto placentário foram identificadas três regiões distintas, a zona glandular exibindo glândulas endometriais (Figura 3b), zona lamelar formada pelas lamelas maternas e fetais (Figura 3c) e a zona juncional representando a interface materno-fetal (Figura 3d). Esses achados condizem com os descritos por Leiser e Koob (1993), Hyttel et al (2012) e com os de Minazaki et al (2008) para placenta de gatas.

Na face materna GN, as placentas apresentaram revestimento epitelial hiperplásico derivado do endométrio materno com aspecto sinuoso, que em vários segmentos invadiam a zona juncional do labirinto placentário. A morfologia da necrose coagulativa observada em toda a extensão da face epitelial materna (Figura 4a), bem como junto aos hematomas marginais e

pontualmente na zona lamelar do labirinto placentário, provavelmente constitui um processo fisiológico da placenta deciduada.

A morfologia histológica mostra perda da integridade do endotélio vascular do labirinto das placentas GN (Figura 4b), dando lugar a conteúdo acidofílico amorfo em meio a neutrófilos íntegros e degenerados, células sinciciotrofoblásticas, citotrofoblásticas, frequentemente permeadas por hemácias íntegras (Figura 4c).

A identificação das células decíduais nas placentas caninas utilizando cortes de parafina foi incerto nos grupos experimentais analisados. Anderson (1969) citou achados de células decíduais da placenta canina utilizando microscopia eletrônica. Vermeirsch et al. (2000) descreveram presença ocasional de células decíduais na placenta canina. Já Minazaki et al. (2008), ao estudar placenta a termo de gatas, descreveram achados relevantes sobre células decíduais, salientando maior presença deste grupo celular na espécie felina.

Na zona juncional de placentas GN foi observado conteúdo de aspecto hialinizado amorfo e acidofílico na parede vascular, chamando a atenção para a predominância das células sinciciotrofoblásticas que se encontravam nesta região devido sua característica na promoção do contato com o endométrio materno, corroborando com os achados de Hyttel et al. (2012).

Na face fetal das placentas GN, foram encontrados vasos do alantóide penetrando no labirinto placentário, o epitélio mostrou células cúbicas com núcleo grande, conforme descrição realizada por Aralla et al. (2013) são denominadas amniócitos que exibem protrusões citoplasmáticas em sua superfície (Figura 4d).

Nas placentas GN, os hematomas marginais apresentaram integridade preservada e presença de cristais de hematóidina, conforme descrição de Enders e Carter (2012), o acúmulo destes cristais nas regiões do hematoma marginal em placentas de cadelas ocorre devido ao catabolismo da hemoglobina, em que a biliverdina convertida em bilirrubina deve ser excretada junto ao ácido glucurônico. Entretanto, em algumas placentas este evento não ocorre, havendo o acúmulo destes cristais (Figura 4e).

Ainda no GN foram identificadas células trofoblásticas próximas as regiões dos hematomas marginais realizando fagocitose de eritrócitos (Figura 4f), o que reforça os achados de Miglino et al. (2006), Minazaki et al. (2008), Ambrósio et al. (2009), revelando uma característica das placentas a termo da espécie canina e felina.

Em continuidade, os hematomas marginais se mostraram delimitados pelo epitélio materno assentado no tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado como lagos sanguíneos repletos de plaquetas, hemácias e leucócitos já organizados, ganhando aspecto de um coágulo.

Placentas do GC mostraram na morfologia histológica, em maior parte dos casos, aspectos similares as placentas do GN (Figura 4g), porém, em determinadas áreas como próxima aos hematomas marginais e na região média da zona lamelar, foi notado áreas coincidentes com as alterações das placentas do GAUP (Figura 4h). Tais alterações compreenderam a dilatação do leito vascular, marginação e diapedese de neutrófilos, áreas demonstrando necrose coagulativa e rarefação das células trofoblásticas.

Steiger et al. (2006), ao estudarem a morfologia placentária canina, evidenciaram picnose nuclear devido a necrose das células sinciciotrofoblásticas. Neste estudo no GC e GAUP as células citotrofoblásticas e sinciciotrofoblásticas mostraram-se tumefeitas e com núcleo picnótico, respectivamente. É provável que este aspecto seja comumente encontrado nas placentas provenientes de distocia.

Para as placentas do GC os hematomas marginais exibiram aspecto que se assemelhou com a integridade observada no GN.

Placentas do GAUP demonstraram na face materna restos celulares e material amorfo, indicativos de necrose, perda da integridade morfológica das hemácias no interior dos vasos da região do labirinto placentário, com aparente dilatação do leito vascular repleto de sangue (Figura 4i). As lamelas do labirinto placentário exibiram aspecto frouxo devido a rarefação das células trofoblásticas.

Nos hematomas marginais das placentas do GAUP foi observado perda morfológica dos elementos figurados do sangue, como as hemácias, leucócitos e plaquetas, indicando organização do coágulo.

Na membrana amniótica na face fetal do GAUP, os amniócitos apresentaram-se de forma descontínua, com frequente ausência das protrusões citoplasmáticas.

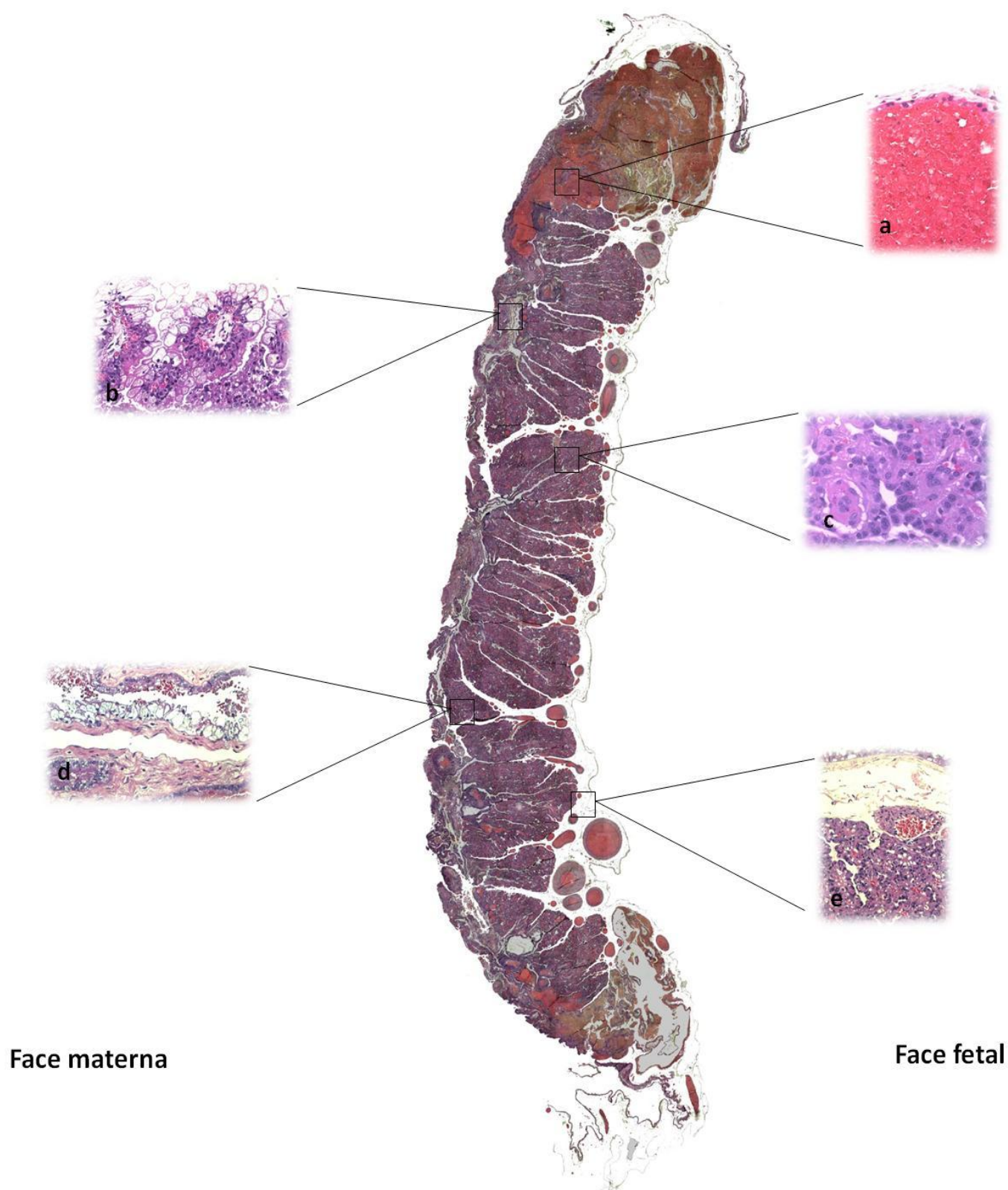


Figura 3 - Fotomicrografia panorâmica de placenta de cadela proveniente de parto normal, HE 10x (a) região do hematoma marginal, intensa coloração avermelhada devido a presença de eritrócitos, (b) zona glandular, presença das glândulas endometriais distendidas devido sua função secretora, (c) zona lamelar, arranjo de lamelas e dobras com presença de células sinciciotrofoblásticas, (d) zona juncional, presença das glândulas endometriais e início das projeções lamelares, (e) face fetal, aparente transição da zona lamelar para o mesênquima fetal, HE 20x. Fonte: Arquivo Pessoal.

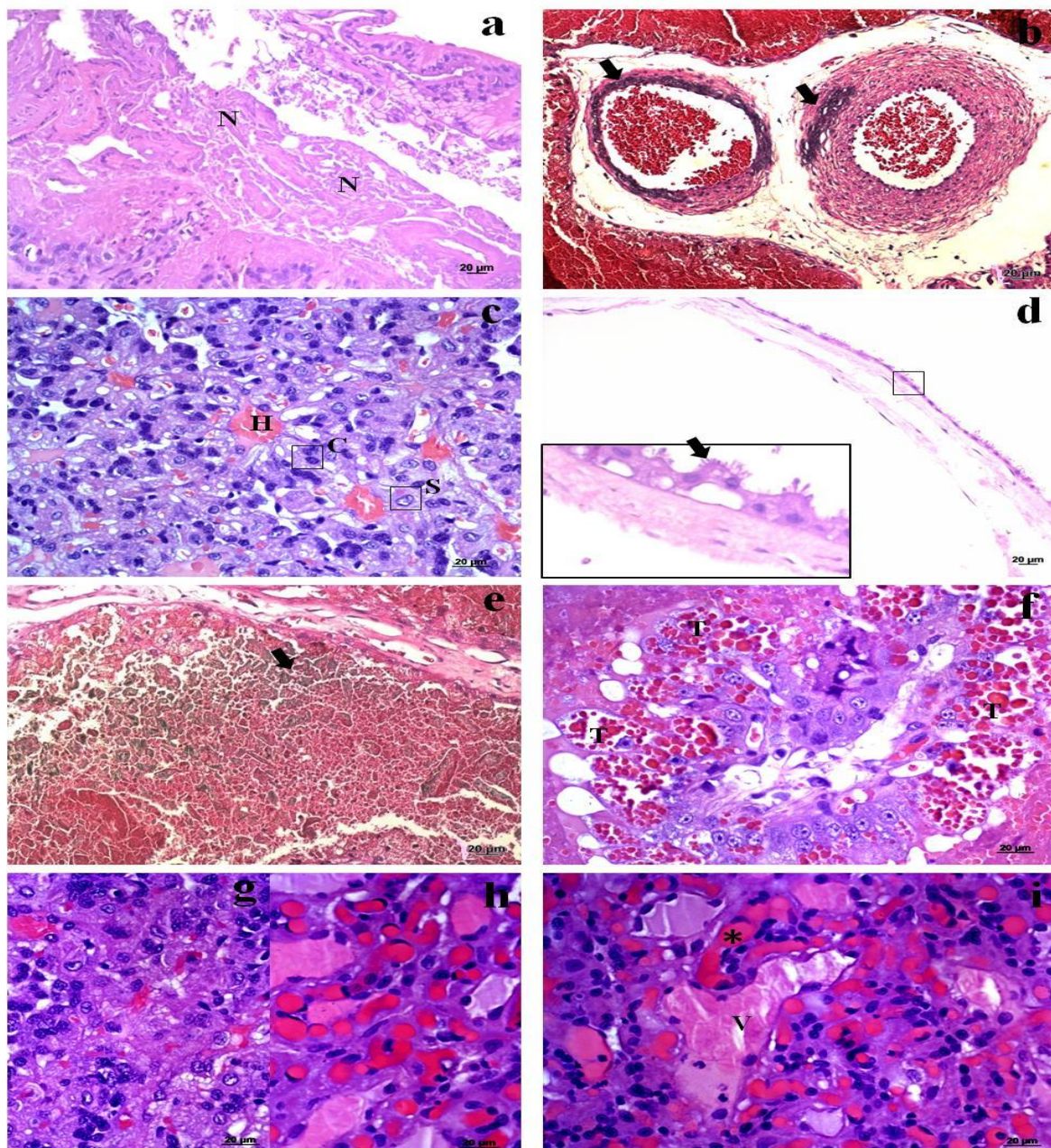


Figura 4 - Fotomicrografia de placenta de cadela (a) GN - necrose coagulativa observada em toda a extensão da face epitelial materna (N), HE 20x, (b) GN - perda da integridade com aparente calcificação do endotélio vascular do labirinto placentário (↓), HE 40x, (c) GN - região lamelar, notar células sincitiotrofoblásticas (S), citotrofoblásticas (C), e vasos sanguíneos com presença de hemácias íntegras (H), HE 40x, (d) GN - Aspecto do alantoamnion, HE 20x, no detalhe notar células cúbicas com núcleo grande (amniócitos), dos quais emergem protrusões citoplasmáticas (↓), HE 40x, (e) GN - hematoma marginal, notar a presença de cristais de hematoidina (↓), HE 20x, (f) GN - células trofoblásticas próximas as regiões dos hematomas marginais realizando eritrofagocitose (T), HE 40x, (g-h) GC - zona lamelar, notar na morfologia, aspectos similares as placentas GN, e na região média da zona lamelar, áreas notadamente coincidentes com as alterações das placentas GAUP, HE 40x, (i) GAUP - zona lamelar, notar perda da integridade morfológica das hemácias no interior dos vasos (*) aparente dilatação do leito vascular (V), lamelas com aspecto frouxo devido a rarefação das células trofoblásticas, HE 40x. Fonte: Arquivo Pessoal.

Apesar do significado das alterações morfológicas placentárias na cadela ainda serem motivo de estudos, na presente pesquisa, foram reconhecidas áreas de hemorragia, necrose, inflamação e calcificação nas placentas dos três grupos experimentais. Barbeito et al. (2010) citaram a complexidade do entendimento das alterações placentárias, pois são muito parecidas em enfermidades distintas, por outro lado, as alterações morfológicas de origem circulatória podem ser encontradas como consequência fisiológica ao trabalho de parto.

As tabelas de 1 a 4 mostram a análise estatística das alterações quanto a presença e intensidade observadas nos grupos analisados (GN, GC e GAUP).

A hemorragia no parênquima placentário (Figura 5a) foi identificada em todos os grupos experimentais, sem apresentar diferença significativa (Tabela 1). Na literatura consultada não há relação deste achado com casos de eutocia e distocia, portanto, sugere-se que seja considerado fisiológico para a morfologia placentária independente ao tipo de parto.

Tabela 1 - Distribuição das áreas de hemorragia no labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina

Grupo	HEMORRAGIA				TOTAL
	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado	
GN	65%(26/40) ^{aB}	15%(6/40) ^{aA}	17,5%(7/40) ^{bA}	2,5%(1/40) ^{aA}	40
GC	82,1%(23/28) ^{aB}	17,9%(5/28) ^{aA}	0%(0/28) ^{aA}	0%(0/28) ^{aA}	28
GAUP	50%(6/12) ^{aA}	16,7%(2/12) ^{aA}	25%(3/12) ^{bA}	8,3%(1/12) ^{aA}	12

GN: grupo parto normal; GC: grupo cesariana; GAUP: grupo atonia uterina primária

^{a,b}: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

^{A,B}: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

A necrose evidenciada junto a face materna foi uma constante nos grupos avaliados. Kumar et al. (2010) descreveram na placenta humana a presença de áreas de necrose devido isquemia e lesão vascular, sendo considerado processo fisiológico em placentas a termo.

Furukawa et al. (2014) relataram que parte da zona glandular e juncional da placenta canina é constituída por restos glandulares e endometriais com aparente aspecto necrótico, resultado do desprendimento da placenta do endométrio durante o parto. O que permite sugerir que a necrose nesta região pode ser considerada fisiológica para as placentas de cadelas.

Contudo, foram observadas na região lamelar focos e áreas de necrose no GC (Figura 5b) e GAUP, que podem representar transtornos circulatórios devido a hipóxia decorrente da distocia, porém, estes resultados não foram estatisticamente relevantes quando comparado ao GN (Tabela 2).

As pesquisas relacionadas a distocia em cadelas limitam-se a indicar como causa alterações maternas ou fetais, portanto, na literatura consultada não há relação dos casos de

distocia com distúrbios morfológicos placentários (WALETT-DARVELID; LINDE- ORSBERG 1994; HOLLINSHEAD et al., 2010; DAVIDSON, 2011).

Tabela 2 - Distribuição das áreas de necrose no labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina

Grupo	NECROSE			TOTAL
	Ausente	Discreto	Moderado	
GN	50%(20/40) ^{aA}	30%(12/40) ^{aA}	20%(8/40) ^{abA}	40
GC	35,7%(10/28) ^{aAB}	53,6%(15/28) ^{aB}	10,7%(3/28) ^{aA}	28
GAUP	25%(3/12) ^{aA}	16,7%(2/12) ^{aA}	58,3%(7/12) ^{bA}	12

GN: grupo parto normal; GC: grupo cesariana; GAUP: grupo atonia uterina primária

^{a,b}: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

^{A,B}: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Apesar de ser um achado frequente para a espécie equina, pouco se sabe sobre a ocorrência de placentite em cadelas devido sua baixa incidência, Dickie e Arbeiter (1993) em estudo retrospectivo realizado na Áustria demonstraram em um período de 19 anos, diagnóstico de apenas 20 casos de placentite na espécie canina correlacionadas com infecções bacterianas via cérvix. Neste estudo foi identificado infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos íntegros e degenerados que ocupavam o lume vascular do labirinto placentário, por vezes permeando restos celulares acidofílicos e conteúdo fibrilar junto ao epitélio uterino, porém, ausência de bactérias.

A inflamação foi raramente observado no GN, esteve pouco presente no GC e predominou nas amostras placentárias do GAUP (Figura 5c), no entanto, estatisticamente não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição das áreas de inflamação no labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina

Grupo	INFLAMAÇÃO			TOTAL
	Ausente	Discreto	Moderado	
GN	72,5%(29/40) ^{aB}	17,5(7/40) ^{aA}	10%(4/40) ^{aA}	40
GC	92,9%(26/28) ^{aB}	7,1%(2/28) ^{aA}	0%(0/28) ^{aA}	28
GAUP	66,7%(8/12) ^{aB}	25%(3/12) ^{aAB}	8,3%(1/12) ^{aA}	12

GN: grupo parto normal; GC: grupo cesariana; GAUP: grupo atonia uterina primária

^{a,b}: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

^{A,B}: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

A calcificação placentária apesar de ainda não relatada na espécie canina, pode ocorrer em outras espécies domésticas e particularmente na placenta humana. Segundo Jones et al. (2000) a deposição de cálcio ocorre normalmente na placenta bovina, acredita-se que esta possa funcionar como reservatório de cálcio para o feto em desenvolvimento, portanto, não deve ser

interpretada como um achado patológico. Para a espécie em estudo não há na literatura correlação desta alteração com significado clínico ou patológico.

Como consequência da necrose e reação inflamatória no tecido placentário, foram detectados focos de calcificação nas placentas estudadas, sendo mais notórios no GC (Figura 5d) e GAUP, provavelmente resultante à distocia (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição das áreas de calcificação no labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina

Grupo	CALCIFICAÇÃO			TOTAL
	Ausente	Discreto	Moderado	
GN	30%(12/40) ^{bA}	45%(18/40) ^{aA}	25%(10/40) ^{aA}	40
GC	0%(0/28) ^{aA}	42,9%(12/28) ^{aB}	57,1%(16/28) ^{bB}	28
GAUP	8,3%(1/12) ^{abA}	33,3%(4/12) ^{aAB}	58,3%(7/12) ^{bB}	12

GN: grupo parto normal; GC: grupo cesariana; GAUP: grupo atonia uterina primária

^{a,b}: comparação de grupos fixada a categoria de resposta ($p < 0,05$)

^{A,B}: comparação das categorias de resposta dentro do grupo ($p < 0,05$)

Os hematomas marginais apresentaram-se como acúmulo de eritrócitos oriundos da degeneração dos vasos maternos nas extremidades da cinta placentária (Figura 5e). Nos grupos estudados foram observadas alterações discretas quanto à apresentação histológica dos hematomas marginais, representadas por dissolução parcial dos eritrócitos, leucócitos sanguíneos e plaquetas que se agregam nas malhas de fibrina como ocorre na formação do coágulo sanguíneo (Figura 5f).

Segundo Miglino et al. (2006) e Ambrósio et al. (2009), os hematomas marginais constituem fonte de ferro para o desenvolvimento fetal. Neste estudo não foram observadas diferenças significativas na integridade das áreas dos hematomas marginais das placentas provenientes dos grupos experimentais (Tabela 5), portanto, a passagem de ferro para o desenvolvimento fetal está presente também nos casos de distocia.

Tabela 5 - Distribuição das áreas de integridade do hematoma marginal segundo os grupos experimentais da espécie canina

Grupo	INTEGRIDADE DOS HEMATOMAS MARGINAIS				TOTAL
	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado	
GN	0%(0/40) ^{aA}	25%(10/40) ^{aB}	65%(26/40) ^{aC}	10%(4/40) ^{aAB}	40
GC	7,1%(2/28) ^{aA}	42,9%(12/28) ^{aB}	42,9%(12/28) ^{aB}	7,1%(2/28) ^{aA}	28
GAUP	0%(0/12) ^{aA}	33,3%(4/12) ^{aB}	33,3%(4/12) ^{aB}	33,3%(4/12) ^{aB}	12

GN: grupo parto normal; GC: grupo cesariana; GAUP: grupo atonia uterina primária

^{a,b}: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

^{A,B}: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

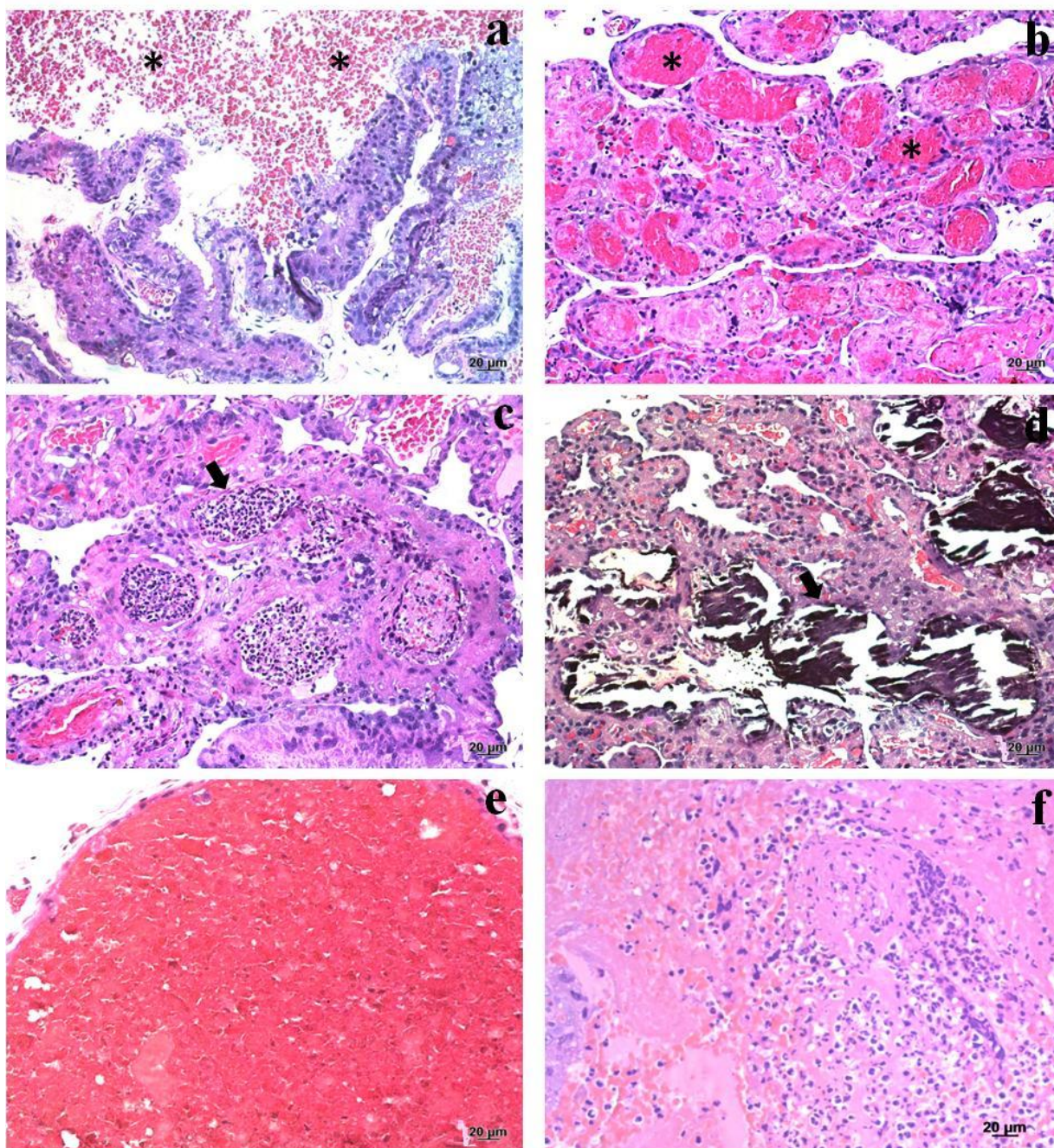


Figura 5- Fotomicrografia de placenta de cadela (a) GAUP - região de interface com epitélio materno apresentando área de hemorragia (*), HE 20x, (b) GC - zona lamelar evidenciando múltiplos focos de necrose (*), HE 20x, (c) GAUP - zona lamelar com infiltrado inflamatório difuso acentuado (↓), HE 20x; (d) GC - zona lamelar mostrando áreas multifocais de calcificação (↓), HE 20x, (e) GN - hematoma marginal, acúmulo de eritrócitos, HE 20x, (f) GAUP - hematoma marginal, dissolução parcial dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, presença de malhas de fibrina, sugerindo a formação do coágulo sanguíneo, HE 20x. Fonte: Arquivo Pessoal.

5.3 Localização imunohistoquímica para vimentina e citoqueratina

Na análise imunohistoquímica dos receptores para vimentina e citoqueratina foram utilizadas 25 placentas, provenientes dos três grupos experimentais (GN:n=13; GC:n=9; GAUP:n=3). Nos controles negativos não houve marcação, já os controles positivos exibiram marcação para ambos anticorpos utilizados.

A coloração específica para vimentina e citoqueratina foi citoplasmática, corroborando o descrito por Vermeirsch et al. (2000) e Minazaki et al. (2008).

As reações imunohistoquímicas para vimentina e citoqueratina caracterizaram as células de origem mesenquimal e epitelial respectivamente, corroborando com Minazaki et al. (2008) em seu estudo com placenta de gatas.

A imunomarcação também mostrou papel fundamental para a delimitação dos tecidos fetal e materno na cinta placentária, pois as células positivas para citoqueratina não pertencem ao trofoblasto fetal, consideradas componente epitelial do labirinto placentário, fortalecendo os achados de Vermeirsch et al. (2000). Minazaki et al. (2008) em seu estudo com placenta de gatas, descreveram o papel da vimentina e citoqueratina para a demarcação dos territórios fetal e materno no labirinto e na paraplacenta.

A vimentina foi expressiva nas células endoteliais da zona lamelar e no mesênquima dos vilos coriônicos (Figura 6a), já a citoqueratina evidenciada na face materna, destacando as glândulas endometriais (Figura 6b).

Neste estudo não foi possível detectar com clareza as células decíduais pela imunomarcação com vimentina. Segundo Vermeirsch et al. (2000) estas células exibem filamentos intermediários de vimentina, Minazaki et al. (2008), na imunolocalização para vimentina, evidenciaram células decíduais na placenta de gatas.

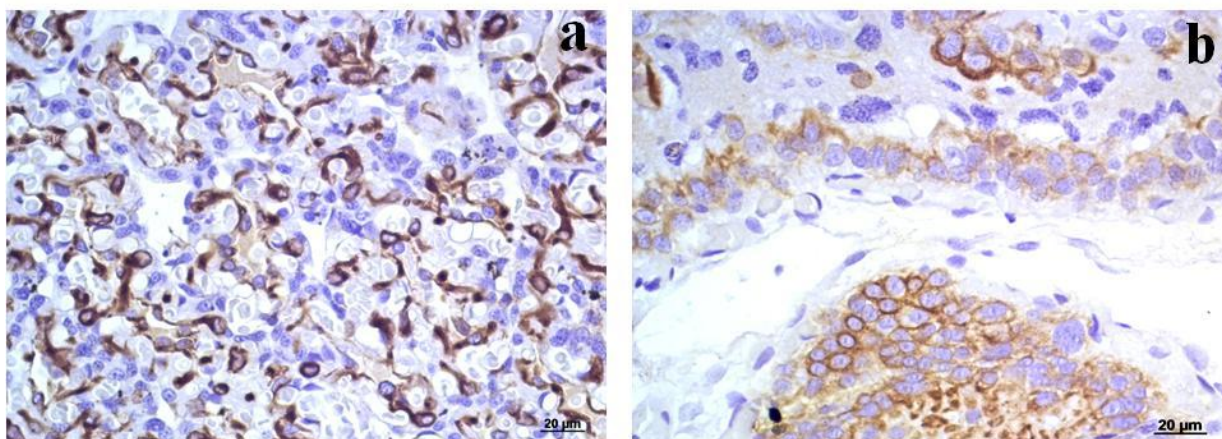


Figura 6- Fotomicrografia de placenta de cadela (a) GN - zona lamelar, intensa e homogênea imunomarcção para vimentina, Hematoxilina de Mayer 40x. (b) GC - face materna, zona glandular, imunomarcção para citoqueratina nas glândulas endometriais, Hematoxilina de Mayer 40x. Fonte: Arquivo Pessoal.

Nas placentas do GN a imunomarcção para vimentina mostrou-se intensa e homogênea em toda zona lamelar (Figura 5a), fato não ocorrido nas placentas do GC e GAUP, que apresentaram a imunomarcção caracterizada pela variação da intensidade ao longo da zona lamelar. Assim as placentas provenientes de parto normal tendem a apresentar na zona lamelar mais estruturas provenientes do trofoblasto, porém, não houve relevância estatística, conforme descrito na tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição da expressão para vimentina nas células do labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina

EXPRESSÃO PARA VIMENTINA				
Grupo	Fraca	Forte < 50% ou fraca > 50%	Forte > 50%	TOTAL
GN	15,4%(2/13) ^{aA}	23%(3/13) ^{aA}	61,6%(8/13) ^{aA}	13
GC	22,2%(2/9) ^{aA}	22,2%(2/9) ^{aA}	55,6%(5/9) ^{aA}	9
GAUP	66,7%(2/3) ^{aA}	0%(0/3) ^{aA}	33,3%(1/3) ^{aA}	3

GN: grupo parto normal; GC: grupo cesariana; GAUP: grupo atonia uterina primária

^{a,b}: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

^{A,B}: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Para citoqueratina não foram encontradas diferenças na análise da imunomarcção nos três grupos experimentais (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição da expressão para citoqueratina nas células do labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina

EXPRESSÃO PARA CITOQUERATINA				
Grupo	Fraca	Forte < 50% ou fraca > 50%	Forte > 50%	TOTAL
GN	38,5%(5/13) ^{aA}	38,5%(5/13) ^{aA}	23%(3/13) ^{aA}	13
GC	22,2%(2/9) ^{aA}	55,6%(5/9) ^{aA}	22,2%(2/9) ^{aA}	9
GAUP	33,3%(1/3) ^{aA}	66,7%(2/3) ^{aA}	0%(0/3) ^{aA}	3

GN: grupo parto normal; GC: grupo cesariana; GAUP: grupo atonia uterina primária

^{a,b}: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

^{A,B}: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

5.4 Localização imunohistoquímica para progesterona e estrógeno α

Para a análise imunohistoquímica dos receptores para progesterona e estrógeno α foram utilizadas 25 placentas, procedentes dos três grupos experimentais (GN:n=13; GC:n=9; GAUP:n=3). Nos controles negativos não houve marcação, por sua vez os controles positivos exibiram marcação para ambos anticorpos utilizados.

Afim de chegar aos resultados pertinentes a este estudo, inicialmente foi testado o Receptor de Progesterona (RP), clone 1A6 (cod M3529) Dako, contudo, sem resultados satisfatórios nas diluições empregadas para o tecido placentário. Testou-se também alíquota dos anticorpos Monoclonal Rabbit Estrogen receptor clone SP1, Biogen® e RP clone SP42, Biogen®, nas diluições 1:50 e 1:100, porém, ambos não demonstraram êxito para este estudo.

A expressão dos receptores para progesterona foi nuclear, corroborando com Vermeirsch et al. (2000) e Veiga et al. (2009). Segundo estes autores não há evidência de RP na porção fetal da placenta, ou seja, estes receptores estão presentes apenas nos tecidos de origem materna.

Sabe-se que há declínio plasmático das concentrações de progesterona que antecede o parto, entretanto, o mesmo não ocorre com a disponibilidade do receptor, fato que explica a intensa expressão de RP nas placentas do GN (Figura 7a) e GC. Desta maneira sugere-se que a concentração sérica da progesterona é mais importante para o desencadeamento do trabalho de parto do que a disponibilidade de seus receptores placentários, de acordo com a literatura (VERMEIRSCH et al., 2000).

A expressão dos receptores de progesterona foi evidente (Tabela 8) em toda região do labirinto placentário, provavelmente nas células decíduais, pois estas foram citadas por Kowalewski et al. (2010) como as únicas capazes de expressar RP.

Nas placentas do GAUP a marcação foi fraca (Figura 7b) ou não houve marcação (Figura 7c) para RP, segundo Kowalewski (2012) e Gram et al. (2014) os receptores de ocitocina

também são expressos nas células decíduais placentárias, portanto, co-localizados aos RP. Como neste grupo houve a administração de ocitocina exógena afim de promover estímulos as contrações uterinas, acredita-se que tal fato possa ter inibido a expressão dos RP nestas placentas.

Embora Vermeirsch et al. (2000) tenham demonstrado a expressão de RE α nas placentas caninas, nas condições em que este trabalho foi realizado, utilizando a técnica de imunohistoquímica, não foi possível a detecção de RE α nas placentas dos três grupos experimentais (Figura 7d). Contudo, Al-Blander (2006), em seu estudo com ratas, sugeriu que ao transcorrer da gestação há uma diminuição dos RE α placentários devido a um mecanismo protetor contra os efeitos deletérios do estrógeno ao final da gestação, pois existe aumento sérico deste hormônio para desencadear o trabalho de parto e por consequência, neste período a placenta apresenta menor capacidade de resposta aos estímulos deste hormônio.

As placentas analisadas neste estudo foram obtidas de gestação a termo, visto que Veiga (2008), utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de RE placentário em cadelas, concluiu que o ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para RE α possui maior expressão até 40º dia de gestação, portanto, placentas a termo tendem a apresentar pouca expressão ou não apresentar RE α , o que pode esclarecer a não exibição destes receptores nas placentas avaliadas.

De acordo com Shoni et al. (2013) placentas normais ou com doenças trofoblásticas gestacionais em humanos possuem RE α nas células decíduais, porém, estes encontram-se em níveis não detectáveis imunohistoquimicamente. Em contrapartida, Rawden e Leavitt (1980) descreveram sobre a inibição de RE α devido a intensa expressão de RP pela ação parácrina entre estes receptores.

No presente estudo as placentas do GN e GC expressaram RP nas células decíduais do labirinto placentário, o que pode ter ocasionado a não expressão dos RE α .

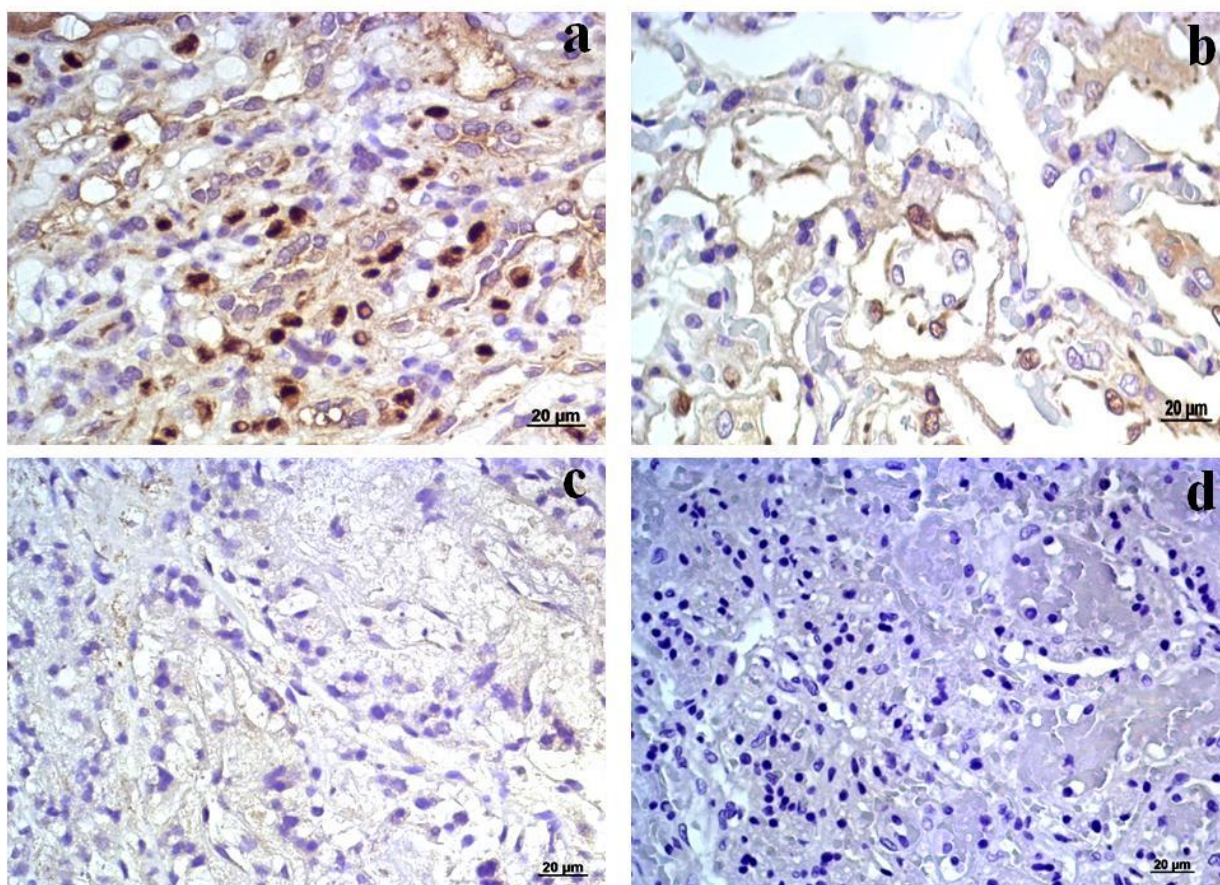


Figura 7 - Fotomicrografia da zona lamelar de placenta de cadela (a) GN - imunomarcção nuclear intensa para progesterona, Hematoxilina de Mayer 40x, (b) GAUP - imunomarcção para progesterona, intensidade fraca, Hematoxilina de Mayer 40x, (c) GAUP - ausência de imunomarcção para progesterona, Hematoxilina de Mayer 40x, (d) GN - ausência de imunomarcção para estrógeno α , Hematoxilina de Mayer 20x. Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 8 - Distribuição da expressão para progesterona nas células do labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina

EXPRESSÃO PARA PROGESTERONA

Grupo	Ausente	Fraca	Forte < 50% ou fraca > 50%	Forte > 50%	TOTAL
GN	0%(0/13) ^{aA}	7,7%(1/13) ^{aA}	61,5%(8/13) ^{bB}	30,8%(4/13) ^{bAB}	13
GC	0%(0/9) ^{aA}	11,1%(1/9) ^{aAB}	55,6%(5/9) ^{bB}	33,3%(3/9) ^{bAB}	9
GAUP	33,3%(1/3) ^{aA}	66,7%(2/3) ^{aA}	0%(0/3) ^{aA}	0%(0/3) ^{aA}	3

GN: grupo parto normal; GC: grupo cesariana; GAUP: grupo atonia uterina primária

^{a,b}: comparação de grupos fixada a categoria de resposta ($p < 0,05$)

^{A,B}: comparação das categorias de resposta dentro do grupo ($p < 0,05$)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Com base no presente estudo podemos concluir que a morfologia macroscópica de placentas a termo de cadelas independe dos casos de eutocia e distocia.
2. Os componentes celulares da placenta da cadela dividem-se em duas regiões distintas, o labirinto placentário que é subdividido em zona glandular, zona juncional e zona lamelar e as regiões dos hematomas marginais caracterizados como aglomerado de eritrócitos provenientes da degeneração do endotélio materno. Característica morfológica que não diferiu entre os grupos analisados.
3. As alterações morfológicas (regiões de hemorragia, necrose tecidual, infiltrado inflamatório e áreas de calcificação) encontradas nas placentas provenientes de eutocia e distocia, nunca antes mencionadas em literatura, podem ser consideradas achados fisiológicos para a placenta da espécie em estudo. A integridade das regiões dos hematomas marginais não foi diferente entre as placentas provenientes de eutocia e distocia.
4. A expressão para vimentina e citoqueratina foi de grande valia na caracterização dos tecidos maternos e fetais presentes na placenta da espécie em estudo.
5. A expressão de receptores para progesterona em placentas provenientes de atonia uterina é fraca ou ausente quando comparada a intensa expressão encontrada nas placentas provenientes de parto normal e cesárea. Placentas caninas a termo podem não expressar receptores para estrógeno α .

Contudo, mais estudos sobre a placenta canina faz-se necessário.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BLADER, D. M. Estrogen receptors alpha e beta in rat placenta: detection by RT-PCR, real-time PCR and Western blotting. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 1-10, 2006.

AMBRÓSIO, C. E. **A barreira placentária em cães (Canis familiares. Linnaeus, 1758):** fluxo sanguíneo materno fetal. 2004. 95 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; MIGLINO, M. A. Biologia do desenvolvimento em cães: comportamento do embrião/feto em relação a placenta. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 133, 2009.

ANDERSON, J. W. Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of dog. The placental Labyrinth. **Anatomical Record**, v. 165, p. 15-36, 1969.

ARALLA, M.; GROPPETTI, D.; CALDARINI, L.; CREMONESI, F.; ARRIGHI, S. Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term. **Research in Veterinary Science**, v. 95, p. 15-22, 2013.

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

BARBEITO, C.G.; GALOSI, M.C.; MONTEAVARO, C.E.; PORTIANSKY, E.L.; ZANUZZI, C.; EÖRY, M.L.; FUENTEALBA, N.; WOULDWYK, M.; LAUBE, P.F.A.; OCAMPOS, G.; FLAMINI, M.A.; GIMENO, E.J. Patología placentaria: conocimientos generados por estudios experimentales, Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria (ANAV). **Anales de la ANAV** p. 87-116, 2010.

BOJRAB, M. F. **Cirurgia dos pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1983. 936 p.

BROLIO, M. P.; AMBRÓSIO, C. E.; FRANCIOLLI, A. R.; MORINI, A.C.; GUERRA, R. R.; MIGLINO, M. A. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 222-232, 2010.

CONCANNON, P.W.; POWERS, M. E.; HOLDER, W.; HANSEL, W. Pregnancy and parturition in the bitch. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 517-526, 1977.

DAVIDSON, A.P. Primary uterine inertia in four labrador bitches. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.47, p. 83-88, 2011.

DELLMANN, H. D. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 397 p.

DICKIE, M. B.; ARBEITER, K. Diagnosis and therapy of the subinvolution of placental sites in the bitch. **Journal Reproduction Fertility**, v. 47, p. 471-475, 1993.

ENDERS, A. C.; CARTER, A. M. The evolving placenta: Convergent evolution of variations in the endotheliochorial relationship. **Placenta**, v. 33, p. 319-326, 2012.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. 785 p.

FURUKAWA, S.; KURODA, Y.; SUGIYAMA, A. A Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 27, p. 11-18, 2014.

GOODMAN, L. A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial population. **Annals of Mathematical Statistics**, v. 35, p. 716-725, 1964.

GOODMAN, L. A. On simultaneous confidence intervals for multinomial population. **Technometrics**, v. 7, p. 247-254, 1965.

GRAM, A.; BOOS, A.; KOWALEWSKI, M. P. Uterine and placental expression of canine oxytocin receptor during pregnancy an normal and induced parturion. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 41-49, 2014.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. v. 7, 513 p.

HENRÍQUEZ, I. R.; SMOK C. S.; PRIETO, G. R. Placenta: compared anatomy and histology. **International Journal of Morphology**, v. 30, p. 1490-1496, 2012.

HEWITT, S. M.; ROBINOWITZ, M.; BOGEN, S. A. **Quality assurance for design control and implementation of immunohistochemistry assays**: approved guideline. 2. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011. (CLSI document I/LA28-A2).

HOLLINSHEAD, F.K.; HANLON, D.W., GILBERT, R.O., VERSTEGEN, J.P., KREKELER, N., VOLKMANN, D.H. Calcium, parathyroid hormone, oxytocin and pH profiles in the whelping bitch. **Theriogenology**, v. 73, p. 1276-1283, 2010.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia veterinária**. 2. ed Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 455.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo populacional de 2014**. Rio de Janeiro: IBGE, 2014.

ITHURRALDE, J.; COSTAS, A.L.; PESSINA, P.; CUETO, E.; FILA.; MEIKLE, A. Immunohistochemical determination of estrogen receptor- α in canine vaginal biopsies throughout proestrus, estrus, and early diestrus. **Theriogenology**, v. 80, p. 805-811, 2013.

JOHNSON, C. A. Pregnancy management in the bitch. **Theriogenology**, v. 70, p. 1412-1417, 2008.

JONES, C. J.; FOX, H. An ultrahistochemical study of the placental content of respiratory enzymes in normal and prolonged pregnancies. **Investigative Cell Pathology**, v. 1, p. 217-225, 1978.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole, 2000. 1415 p.

JUTKOWITZ, L. A. Reproductive emergencies. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 35, p. 397-420, 2005.

KOWALEWSKI, M. P. Endocrine and molecular Control of Luteal and placental Function in Dogs: A Review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 19-24, 2012.

KOWALEWSKI, M. P.; BECERIKLISOY, H. B.; PFARRER, C.; ASLAN; S.; KINDAHL, H.; KUCUKASLAN, I.; HOFFMANN, B. Canine placenta: a source of prepartal prostaglandins during normal and antiprogesterin-induced parturition. **Reproduction Research**, v. 139, p. 655-664, 2010.

KOWALEWSKI, M. P.; MICHEL, E.; GRAM, A.; BOOS, A.; GUSCETTI, F.; HOFFMANN, B.; ASLAN; S.; REICHLER, I. Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal

changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p. 109, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS L. S. **Bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1480 p.

KUTZLER, M. A. Dystocia and obstetric crises. In: SILVERSTEIN, D.C.; HOPPER, K. (Eds.). **Small animal critical care medicine**. St. Louis: Elsevier Saunders, 2009. p. 611-615.

LACROIX, C. F. E. Endocrinología y Fisiología de hembra canina. In: GOBELLO, C. **Temas de reproducciones de caninos y felinos por autores latino-americanos**. Buenos Aires: Grafica Latina, 2004. p. 175-190.

LEISER, R.; KOOB, B. Developmental and characteristics of placentation in a carnivore, the domestic cat. **Journal of Experimental Zoology**, v. 266, p. 642-656, 1993.

LINDE-FORSBERG, C. Abnormalities in pregnancy, parturition and the periparturient period. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.). **Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat**. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. v. 6, p. 1655-1667.

LÚCIO, C. F. **Influência das condições obstétricas ao nascimento sobre padrões de vitalidade e bioquímica neonatal na espécie canina**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LUZ, M. R. Parto en perras y gatas. **Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latino-americanos**. La Plata: Gráfica Latina, 2004. p. 237-248.

MARINELLI, L.; ROTA, A.; CARNIER, P.; DA DALT, L.; GABAI, G. Factors affecting progesterone production in corpora lutea from pregnant and diestrous bitches. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 289-300, 2009.

MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; WENCESLAU, C. V.; PFARRER, C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, v. 66, p. 1699-1702, 2006.

MINAZAKI, C. K.; GAGIOTI, S.; ZAGO, D.; TERRA, W.; ARAUJO, V. C.; OLIVEIRA, R. A.; BEVILACQUA, E. Acid phosphatase and cathepsin D are active expressed enzymes in the placenta of the cat. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 326-334, 2008.

MOWA, C. N.; IWANAGA, T. Differential distribution of oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization. **Journal Endocrinology Investigation**, v. 165, p. 59-66, 2000.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 512 p.

NISHIYAMA, T.; TSUMAGARI, S.; ITO, M.; KIMURA, J.; WATANABE, K.; TAYA, K.; TAKEISHI, M. Immunohistochemical Study of Steroidogenic Enzymes in the Ovary and Placenta During Pregnancy in the Dog. **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 28, p. 125-129, 1999.

PELLETIER, G.; EL ALF, Y. M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, p. 4835-4840, 2000.

PRESTES, N. C. Como e quando intervir no parto de cadelas. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 4, p. 60-64, 2001.

PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 241.

RAWDEN, W. E.; LEAVITT, W. W. Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen receptor: Dependence on RNA and protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, p. 5856-5860, 1980.

REECE, W. O. **Dukes - fisiologia dos animais domésticos I**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007. 954 p.

SHONI, M.; NAGYMANYOKI, Z.; VITONIS, A. F.; JIMENEZ, C.; SHU-WING, N. G.; QUADE, B. J.; BERKOWITZ, R. S. p-21-Activated kinase-1, -4 and -6 and estrogen receptor

expression pattern in normal placenta and gestational trophoblastic diseaseS. **Gynecologic Oncology**, v. 131, p. 759-763, 2013.

SMITH-CARR, S. Gynecologic emergencies. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.). **Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat**. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. p. 450-452.

STEIGER, K.; POLITT, T.; HOEFTMANN, T.; MEYER-LINDENBERG, A.; H. A. SCHOON.; A. R. GUNZEL-APEL. Morphology of canine placenta sites after induced embryonic or fetal death. **Theriogenology**, v. 66, p. 1709-1714, 2006.

VEIGA, G. A. L. **Expressão gênica dos receptores de estrógeno e ocitocina no endométrio, miométrio e placenta durante a gestação e parto em cadelas**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

VEIGA, G. A. L.; SILVA, L. C. G.; LÚCIO, C. F.; RODRIGUES, J. A.; VANNUCCHI, C. I. Endocrinologia da gestação e parto em cadelas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 3-10, 2009.

VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; LAUWERS, H. Immunohistochemical Detections of the Estrogen Receptor- α an Progesterone Receptor in the Canine Pregnant Uterus and Placental Labyrinth. **The Anatomical Record**, v. 260, p. 42-50, 2000.

WALETT-DARVELID, A.; LINDE-FORSBERG, C. Dystocia in the bitch: a retrospective study of 182 cases. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, p. 402-407, 1994.

WOODING; F.B.P; FLINT, A.P.F. Placentação. Marshall's Physiology of reproduction. Pregnancy and Lactation Part one: ovulation and early pregnancy. 4ed., London: Chapman & Hall, p.233-460, 1994.

WU, W.; BROOKS, J.; MILLAR, M.R.; LEDGER, W. L.; GLAISER, A. F.; MCNEILLY, A. S. Immunolocalization of oestrogen and progesterona receptors in the human decidua in relation to prolactin production. **Human Reproduction**, v. 8, p. 1129-1135, 1993.

Trabalho a ser enviado para a **Revista Brasileira de Reprodução Animal**
(Normas para publicação especificadas no Anexo 16)

Análise da expressão de receptores para progesterona e estrógeno α em placentas caninas provenientes de eutocia e distocia

Analysis of the expression of receptors for progesterone and estrogen α in canine placentas from eutocia and dystocia

**I.F.Costa^{1,5}, N.C. Prestes¹, M.C.R. Luvizotto², M.F. Costa³, J. Lourenção¹, C.R. Padovani⁴,
R.L. Amorim¹,**

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, SP

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Araçatuba, SP

³Médica veterinária autônoma – Manduri, SP

⁴Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, SP

⁵Correspondência: isa_frazon@hotmail.com

Resumo

Objetiva-se com o presente estudo a análise da expressão de receptores para progesterona e estrógeno α em placentas de cadelas e a possível correlação com os casos de distocia. Foram coletadas 25 placentas, provenientes de 25 cadelas, com e sem raça definida, conforme o tipo de parto as placentas foram divididas em três grupos experimentais, GN (n=13) placentas obtidas de parto normal, GC (n=9) placentas obtidas de cesariana e GAUP (n=3) placentas oriundas de cadelas em atonia uterina primária. Os fragmentos placentários foram parafinizados e seccionados em cortes de 3 μ m, a análise imunohistoquímica foi realizada com incubação do anticorpo primário na diluição de 1:50 para progesterona e estrógeno α . A expressão dos RP foi evidente nas células decíduais do labirinto placentário no GN e GC. Nas placentas GAUP não houve marcação ou esta se apresentou fraca e escassa para RP. Nas condições em que este trabalho foi realizado, não foi possível a detecção de RE α nas placentas dos três grupos experimentais. Conclui-se que expressão de RP em placentas provenientes de atonia uterina é fraca ou ausente quando comparada a intensa expressão encontrada nas placentas provenientes de parto normal e cesárea. Placentas caninas a termo podem não expressar RE α .

Palavras-chave: cadela, labirinto placentário, célula decidual, receptor de progesterona, receptor de estrógeno

Abstract

The Objective was to analyze the expression from progesterone and estrogen α receptor in placentas of bitches and to correlate it with cases of dystocia. We collected 25 placentas from 25 bitch in labor. The placentas were divided as the type of delivery into three experimental groups, GN (n=13) placentas obtained from normal delivery, GC (n=9) placentas obtained from caesarean section and GAUP (n=3) placentas obtained from bitches in primary uterine atony. Placental samples were embedded in parafin and sectioned of 3 μ m were cut. Immunohistochemical analysis were performed with primary antibody incubation at 1:50 dilution for progesterone and estrogen α . The expression of RP was evident in decidual cells of placental labyrinth in both GN and CG groups. In the GAUP samples there was no marking or the immunoexpression was weak and scarce for RP. In the conditions in which this work was carried out, it was not possible to detect RE α in the placentas from all experimental groups. We concluded that PR expression in placentas from bitches in uterine atony is weak or absent when compared to placentas from normal and cesarean delivery. Canine placentas term do not express RE α .

Key words: bitch, placental labyrinth, decidual cell, progesterone receptor, estrogen receptor.

Introdução

A indústria *pet* brasileira ocupa o segundo lugar absoluto no mercado mundial. O número de cães no país chega a 52,2 milhões, equivalente a 1,8 cachorro por domicílio (IBGE, 2014). Inicialmente as pesquisas pertinentes à reprodução animal, eram direcionadas aos animais de produção, com a evolução do vínculo entre o cão e o homem, os estudos relacionados a esta espécie tornaram-se mais relevantes (Aralla et al., 2013).

A placentação e o desenvolvimento das membranas fetais na espécie canina atualmente são estudados de forma extensiva, já que o conhecimento da morfologia placentária possibilita reconhecer corretamente alterações patológicas e sua possível correlação com a viabilidade neonatal (Miglino et al., 2006; Aralla et al., 2013).

A placenta é uma estrutura complexa, formada a partir da união das membranas fetais com o endométrio. Existente somente nos mamíferos, é considerada um órgão de transição presente apenas no período gestacional e sua função é a ligação entre a mãe e feto para promover suprimento de oxigênio e nutrientes, remoção de detritos metabólicos, produção e secreção de hormônios, fatores de crescimento fetal e regulação do ambiente uterino do feto (Prestes; Landim-Alvarenga, 2006).

Sabe-se que a placenta tem capacidade de produzir e secretar hormônios, além de possuir receptores hormonais. Os principais hormônios reguladores da função e crescimento do trato reprodutivo da fêmea são a progesterona e o estrógeno cuja ação é mediada pela interação específica com seus receptores intracelulares, entretanto, a presença destes receptores na placenta canina ainda não está bem estabelecida (Veiga et al., 2009; Ithurrealde et al., 2013).

Conforme descrito por Henríquez et al. (2012), a progesterona integra a formação das células decíduais no útero materno, cuja função é vital para a nutrição do embrião no início do período gestacional. Kowalewski (2012) menciona as células decíduais como sendo a única célula da placenta canina capaz de expressar receptores de progesterona (RP).

75 Alguns estudos demonstraram que o estrógeno é sintetizado na placenta de humanos e
76 animais, entretanto não há síntese deste hormônio na placenta de cães, ratos e coelhos, fato
77 atribuído ao curto período gestacional nestas espécies, em contrapartida seres humanos,
78 primatas, ruminantes e equinos são capazes de produzir estrógeno placentário por apresentarem
79 longo período gestacional (Nishiyama et al., 1999).

80 A expressão de RP e de RE α estão significativamente correlacionadas (Veiga et al.,
81 2009), de acordo com Wu et al. (1993) estes receptores foram observados nas células decíduais
82 de placentas de primatas e humanos. Segundo Vermeirsch et al. (2000) RP e RE α estão presentes
83 apenas na porção materna da placenta canina, acarretando na possível não regulação direta da
84 função placentária por ambos hormônios.

85 Objetiva-se com o presente estudo a análise da expressão de receptores para progesterona
86 e estrógeno alfa (α) em placentas de cadelas e a possível correlação com os casos de distocia.

87 **Material e Métodos**

88 Os procedimentos experimentais do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de
89 Ética Institucional, sob o número de protocolo 129/2013-CEUA.

90 Foram coletadas 25 placentas, provenientes de 25 cadelas, com e sem raça definida,
91 idade entre dois e 10 anos, com peso médio 20Kg, primíparas e múltíparas, fecundadas por
92 monta natural, previamente submetidas a exame clínico para confirmação da hígidez.

93 De acordo com a necessidade apresentada individualmente pelas cadelas, a coleta das
94 placentas ocorreu a partir de parto normal, cesariana ou utilizando fármacos indutores do parto,
95 sendo o protocolo utilizado: ocitocina 1UI/kg por via subcutânea, gluconato de cálcio 50mg/kg
96 por via intravenosa (IV) e glicose 0,5g/kg/IV/hora. Conforme o tipo de parto as placentas foram
97 divididas em três grupos experimentais, GN (n=13) placentas obtidas de parto normal, GC (n=9)
98 placentas obtidas de cesariana e GAUP (n=3) placentas oriundas de cadelas em atonia uterina
99 primária.

100 Fragmentos 1cm x 1cm foram seccionados da região próxima ao cordão umbilical e
101 armazenados em formol tamponado 10% durante 48 horas e posteriormente incluídos em
102 parafina na orientação transversal.

103 Os fragmetos placentários parafinizados foram seccionados em cortes de 3µm de
104 espessura e colocados em lâminas silanizadas, posteriormente desparafinizados em xilol e
105 seguidamente hidratados em banhos de álcool. A recuperação antigênica foi realizada em
106 solução de citrato de sódio 10mM, pH 6,0 corrigido com hidróxido de sódio, com incubação em
107 panela de pressão tipo pascal (Dako, USA).

108 O bloqueio das peroxidases endógenas procedeu-se em solução de peróxido de
109 hidrogênio a 8% por 20 minutos, sucessivamente o bloqueio das ligações inespecíficas foi
110 realizado com leite em pó desnatado (3g/100mL) por 60 minutos e posteriormente lavagens em
111 solução tampão Tris-pH 7,4.

112 Foi realizada a incubação com o anticorpo primário na diluição de 1:50 para progesterona
113 e estrógeno α (anticorpo monoclonal cat. n° 1546, Immunotech, France e anticorpo Monoclonal
114 Mouse Anti- Human Estrogen Receptor α clone 1D5 - Dako - CA, USA, Cód M7047,
115 respectivamente) em câmara úmida, durante 18 horas, à de 4°C.

116 Para ambos receptores os controles positivos utilizados foram cortes histológicos de
117 endométrio canino com hiperplasia endometrial cística e glândula mamária canina com presença
118 de células tumorais. Como controle negativo a lâmina contendo tecido placentário foi incubada
119 omitindo o anticorpo primário.

120 Após o período de incubação, as lâminas foram submetidas a banhos de TRIS e
121 posteriormente incubadas com o anticorpo secundário Histofine® (polimero hrp - Nichirei
122 Bioscience cod. 414154f) por 30 minutos em estufa a 27° e ao término desta etapa, nova
123 lavagem com solução tampão TRIS - pH 7,4 e revelação com o cromógeno 3,3 -
124 diaminobenzidina (DAB) durante 5 minutos.

Os cortes histológicos foram contracolorados com hematoxilina de Mayer por 2 minutos, em seguida foi realizada a desidratação do material com banhos de álcool e xilol, por fim, as lâminas foram montadas utilizando-se resina sintética e posteriormente avaliadas em microscopia óptica, quanto a intensidade da imunomarcação de acordo com o descrito por Hewitt et al. (2011), para marcação nuclear, onde 0: ausência de coloração, 1: coloração fraca em menos de 50% das células, 2: coloração forte em menos de 50% das células ou coloração fraca em mais de 50% das células e 3: coloração forte em mais de 50% das células.

Para a associação das variáveis, imunomarcação das células para estrógeno α e progesterona nos tecidos placentários dos grupos experimentais utilizou-se o teste de Goodman, complementado com as comparações múltiplas entre e dentro de populações multinomiais (Goodman, 1964 e 1965). A discussão dos resultados foi realizada no nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

Nos controles negativos não houve marcação, já os controles positivos exibiram marcação para ambos anticorpos utilizados.

A fim de chegar aos resultados pertinentes a este estudo, inicialmente foi testado o Receptor de Progesterona (RP), clone 1A6 (cod M3529) Dako, contudo sem resultados satisfatórios nas diluições empregadas para o tecido placentário. Testou-se também alíquota dos anticorpos Monoclonal Rabbit Estrogen receptor clone SP1, Biogen® e RP clone SP42, Biogen®, nas diluições 1:50 e 1:100, porém, ambos não demonstraram êxito para este estudo.

A expressão dos receptores para progesterona foi nuclear, corroborando com Vermeirsch et al. (2000) e Veiga et al. (2009). Segundo estes autores não há evidência de RP na porção fetal da placenta, ou seja, estes receptores estão presentes apenas nos tecidos de origem materna.

Sabe-se que há declínio plasmático das concentrações de progesterona que antecede o parto, entretanto, o mesmo não ocorre com a disponibilidade do receptor, fato que explica a

150 intensa expressão de RP nas placentas do GN (Figura 7a) e GC. Desta maneira sugere-se que a
151 concentração séria da progesterona é mais importante para o desencadeamento do trabalho de
152 parto do que a disponibilidade de seus receptores placentários, de acordo com a literatura
153 (Vermeirsch et al., 2000).

154 A expressão dos receptores de progesterona foi evidente (Tabela 8) em toda região do
155 labirinto placentário, provavelmente nas células decíduais, pois estas foram citadas por
156 Kowalewski et al. (2010) como as únicas capazes de expressar RP.

157 Nas placentas do GAUP a marcação foi fraca (Figura 7b) ou não houve marcação (Figura
158 7c) para RP, segundo Kowalewski et al. (2010) e Gram et al. (2014) os receptores de ocitocina
159 também são expressos nas células decíduais placentárias, portanto, co-localizados aos RP. Como
160 neste grupo houve a administração de ocitocina exógena afim de promover estímulos as
161 contrações uterinas, acredita-se que tal fato possa ter inibido a expressão dos RP nestas
162 placentas.

163 Embora Vermeirsch et al. (2000) tenham demonstrado a expressão de RE α nas placentas
164 caninas, nas condições em que este trabalho foi realizado, utilizando a técnica de
165 imunohistoquímica, não foi possível a detecção de RE α nas placentas dos três grupos
166 experimentais (Figura 7d). Contudo, Al-Blander (2006), em seu estudo com ratas, sugeriu que ao
167 transcorrer da gestação há uma diminuição dos RE α placentários devido a um mecanismo
168 protetor contra os efeitos deletérios do estrógeno ao final da gestação, pois existe aumento sérico
169 deste hormônio para desencadear o trabalho de parto e por consequência, neste período a
170 placenta apresenta menor capacidade de resposta aos estímulos deste hormônio.

171 As placentas analisadas neste estudo foram obtidas de gestação a termo, visto que Veiga
172 (2009), utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de RE
173 placentário em cadelas, concluiu que o ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para RE α possui
174 maior expressão até 40º dia de gestação, portanto, placentas a termo tendem a apresentar pouca

expressão ou não apresentar RE α , o que pode esclarecer a não exibição destes receptores nas placentas avaliadas.

De acordo com Shoni et al. (2013) placentas normais ou com doenças trofoblásticas gestacionais em humanos possuem RE α nas células decíduais, porém, estes encontram-se em níveis não detectáveis imunohistoquimicamente. Em contrapartida, Rawden e Leavitt (1980) descreveram sobre a inibição de RE α devido a intensa expressão de RP pela ação parácrina entre estes receptores.

No presente estudo as placentas do GN e GC expressaram RP nas células decíduais do labirinto placentário, o que pode ter ocasionado a não expressão dos RE α .

Tabela 1 - Distribuição da expressão para progesterona nas células do labirinto placentário segundo os grupos experimentais da espécie canina

EXPRESSÃO PARA PROGESTERONA

Grupo	Ausente	Fraca	Forte < 50% ou fraca > 50%	Forte > 50%	TOTAL
GN	0%(0/13) ^{aA}	7,7%(1/13) ^{aA}	61,5%(8/13) ^{bB}	30,8%(4/13) ^{bAB}	13
GC	0%(0/9) ^{aA}	11,1%(1/9) ^{aAB}	55,6%(5/9) ^{bB}	33,3%(3/9) ^{bAB}	9
GAUP	33,3%(1/3) ^{aA}	66,7%(2/3) ^{aA}	0%(0/3) ^{aA}	0%(0/3) ^{aA}	3

GN: grupo parto normal; GC: grupo cesariana; GAUP: grupo atonia uterina primária

^{a,b}: comparação de grupos fixada a categoria de resposta (p<0,05)

^{A,B}: comparação das categorias de resposta dentro do grupo (p<0,05)

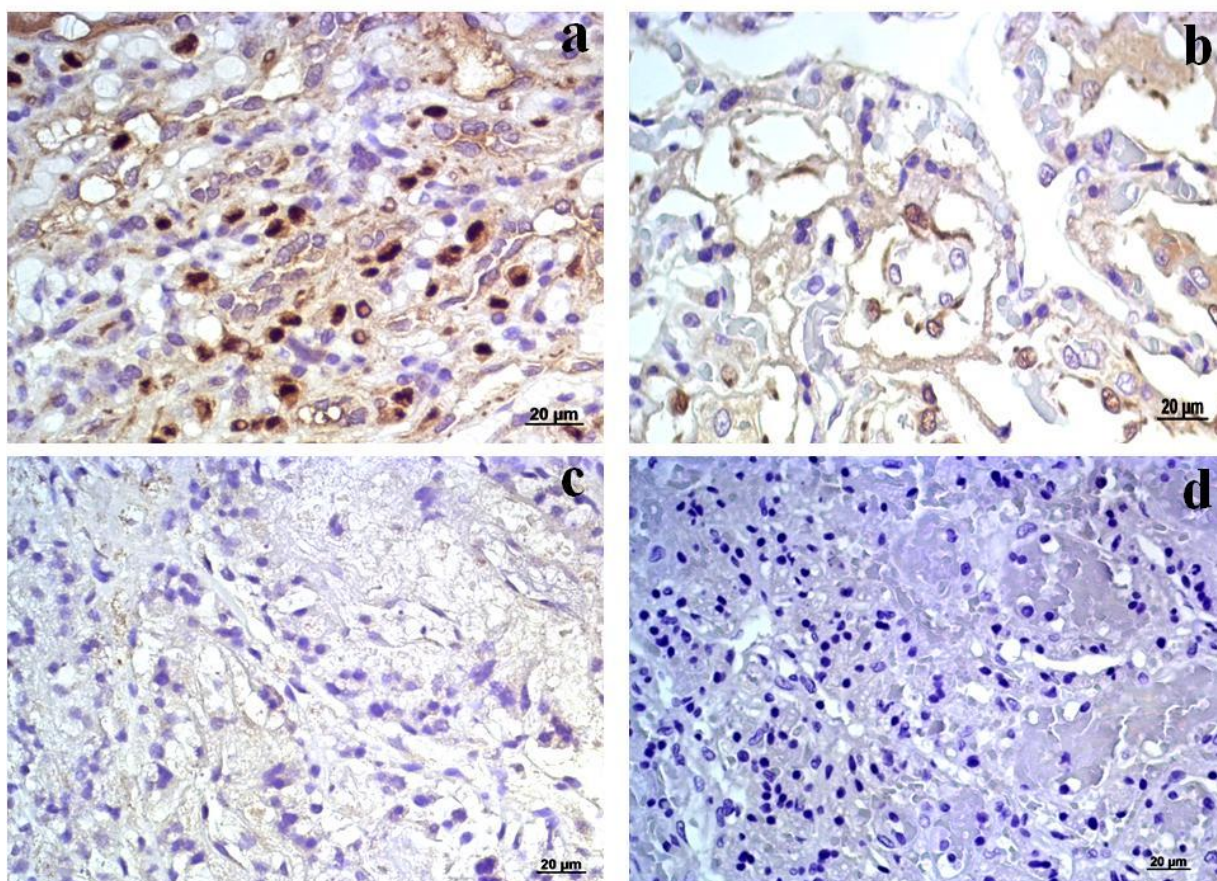


Figura 1 - Fotomicrografia da zona lamelar de placenta de cadela (a) GN - imunomarcção nuclear intensa para progesterona, Hematoxilina de Mayer 40x, (b) GAUP - imunomarcção para progesterona, intensidade fraca, Hematoxilina de Mayer 40x, (c) GAUP - ausência de imunomarcção para progesterona, Hematoxilina de Mayer 40x, (d) GN - ausência de imunomarcção para estrógeno α , Hematoxilina de Mayer 20x. Fonte: Arquivo Pessoal.

Conclusões

Com base no presente estudo conclui-se que a expressão de receptores para progesterona em placentas provenientes de atonia uterina é fraca ou ausente quando comparada a intensa expressão encontrada nas placentas provenientes de parto normal e cesárea. Placentas caninas a termo podem não expressar receptores para estrógeno α .

Agradecimentos

À Fapesp pelo auxílio pesquisa concedido.

Referências

- 204
- 205 AL-BLADER, D. M. Estrogen receptors alpha e beta in rat placenta: detection by RT-PCR, real-
 206 time PCR and Western blotting. **Reproductive Biology an Endocrinology**, v. 4, p. 1-10, 2006.
- 207 ARALLA, M.; GROPPETTI, D.; CALDARINI, L.; CREMONESI, F.; ARRIGHI, S.
 208 Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from
 209 early implantation to term. **Research in Veterinary Science**, v. 95, p. 15-22, 2013.
- 210 GOODMAN, L. A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial
 211 population. **Annals of Mathematical Statistics**, v. 35, p. 716-725, 1964.
- 212 GOODMAN, L. A. On simultaneous confidence intervals for multinomial population.
 213 **Technometrics**, v. 7, p. 247-254, 1965.
- 214 GRAM, A.; BOOS, A.; KOWALEWSKI, M. P. Uterine and placental expression of canine
 215 oxytocin receptor during pregnancy an normal and induced parturion. **Reproduction in**
 216 **Domestic Animals**, v. 49, p. 41-49, 2014.
- 217 HEWITT, S. M.; ROBINOWITZ, M.; BOGEN, S. A. **Quality assurance for design control**
 218 **and implementation of immunohistochemistry assays**: approved guideline. 2. ed. Wayne:
 219 Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011. (CLSI document I/LA28-A2).
- 220 HENRÍQUEZ, I. R.; SMOK C. S.; PRIETO, G. R. Placenta: compared anatomy and histology.
 221 **International Journal of Morphology**, v. 30, p. 1490-1496, 2012.
- 222 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo populacional de 2014**. Rio de
 223 Janeiro: IBGE, 2014.

- 224 ITHURRALDE, J.; COSTAS, A.L.; PESSINA, P.; CUETO, E.; FILA.; MEIKLE, A.
 225 Immunohistochemical determination of estrogen receptor- α in canine vaginal biopsies
 226 throughout proestrus, estrus, and early diestrus. **Theriogenology**, v. 80, p. 805-811, 2013.
- 227 KOWALEWSKI, M. P.; BECERIKLISOY, H. B.; PFARRER, C.; ASLAN; S.; KINDAHL, H.;
 228 KUCUKASLAN, I.; HOFFMANN, B. Canine placenta: a source of prepartal prostaglandins
 229 during normal and antiprogesterin-induced parturition. **Reproduction Research**, v. 139, p. 655-
 230 664, 2010.
- 231 KOWALEWSKI, M. P.; MICHEL, E.; GRAM, A.; BOOS, A.; GUSCETTI, F.; HOFFMANN,
 232 B.; ASLAN; S.; REICHLER, I. Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal
 233 changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced
 234 parturition. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p. 109, 2012.
- 235 MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; WENCESLAU, C. V.; PFARRER,
 236 C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes.
 237 **Theriogenology**, v. 66, p. 1699-1702, 2006.
- 238 NISHIYAMA, T.; TSUMAGARI, S.; ITO, M.; KIMURA, J.; WATANABE, K.; TAYA, K.;
 239 TAKEISHI, M. Immunohistochemical Study of Steroidogenic Enzymes in the Ovary and
 240 Placenta During Pregnancy in the Dog. **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 28, p. 125-129,
 241 1999.
- 242 RAWDEN, W. E.; LEAVITT, W. W. Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen
 243 receptor: Dependence on RNA and protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of**
 244 **Sciences**, v. 77, p. 5856-5860, 1980.

- 245 PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia veterinária**. Rio de Janeiro:
246 Guanabara Koogan, 2006. p. 241.
- 247 SHONI, M.; NAGYMANYOKI, Z.; VITONIS, A. F.; JIMENEZ, C.; SHU-WING, N. G.;
248 QUADE, B. J.; BERKOWITZ, R. S. p-21-Activated kinase-1, -4 and -6 and estrogen receptor
249 expression pattern in normal placenta and gestational trophoblastic diseaseS. **Gynecologic**
250 **Oncology**, v. 131, p. 759-763, 2013.
- 251 VEIGA, G. A. L. **Expressão gênica dos receptores de estrógeno e ocitocina no endométrio,**
252 **miométrio e placenta durante a gestação e parto em cadelas**. 2008. 73 f. Dissertação
253 (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São
254 Paulo, 2008.
- 255 VEIGA, G. A. L.; SILVA, L. C. G.; LÚCIO, C. F.; RODRIGUES, J. A.; VANNUCCHI, C. I.
256 Endocrinologia da gestação e parto em cadelas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.
257 33, p. 3-10, 2009.
- 258 VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; LAUWERS, H. Immunohistochemical Detections of the
259 Estrogen Receptor- α an Progesterone Receptor in the Canine Pregnant Uterus and Placental
260 Labyrinth. **The Anatomical Record**, v. 260, p. 42-50, 2000.
- 261 WU, W.; BROOKS, J.; MILLAR, M.R.; LEDGER, W. L.; GLAISER, A. F.; MCNEILLY, A. S.
262 Immunolocalization of oestrogen and progesterone receptors in the human decidua in relation to
263 prolactin production. **Human Reproduction**, v. 8, p. 1129-1135, 1993.

ANEXOS

Anexo 1 - Distribuição das áreas de hemorragia segundo o *status* reprodutivo (primípara ou múltipara)

Áreas de Hemorragia					
	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado	TOTAL
Primípara	36 (70,6) _{aB}	9(17,6) _{aA}	5(9,8) _{aA}	1(2,0) _{aA}	51
Múltipara	19(65,5) _{aB}	4(13,8) _{aA}	5(17,2) _{aA}	1(3,4) _{aA}	29

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 2 - Distribuição das áreas de necrose segundo o *status* reprodutivo (primípara ou múltipara)

Áreas de Necrose				
	Ausente	Discreto	Moderado	TOTAL
Primípara	21(41,2) _{aA}	20(39,2) _{aA}	10(19,6) _{aA}	51
Múltipara	12(41,4) _{aA}	9(31,0) _{aA}	8(27,6) _{aA}	29

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 3 - Distribuição das áreas de inflamação segundo o *status* reprodutivo (primípara ou múltipara)

Áreas de Inflamação				
	Ausente	Discreto	Moderado	TOTAL
Primípara	37(72,5) _{aB}	10(19,6) _{aA}	4(7,8) _{aA}	51
Múltipara	26(89,7) _{aB}	2(6,9) _{aA}	1(3,4) _{aA}	29

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 4 - Distribuição das áreas de calcificação segundo o *status* reprodutivo (primípara ou múltipara)

Áreas de Calcificação				
	Ausente	Discreto	Moderado	TOTAL
Primípara	12(23,5) _{bA}	21(41,2) _{aA}	18(35,3) _{aA}	51
Múltipara	1(3,4) _{aA}	13(44,8) _{aB}	15(51,7) _{aB}	29

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 5 - Distribuição das áreas de hematoma marginal segundo o *status* reprodutivo (primípara ou múltipara)

Áreas de Hematoma Marginal					
	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado	TOTAL
Primípara	(0,00) _{aA}	16(31,4) _{aBC}	29(56,9) _{aC}	6(11,8) _{aB}	51
Múltipara	2(6,9) _{aA}	10(34,5) _{aB}	13(44,8) _{aB}	4(13,8) _{aAB}	29

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 6 - Distribuição das áreas de hemorragia segundo a avaliação do filhote ao nascimento

Áreas de Hemorragia					
	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado	TOTAL
Morto	8(61,5) _{aB}	3(23,1) _{aAB}	2(15,4) _{aAB}	0(0,0) _{aA}	13
Natimorto	3(42,9) _{aA}	2(28,6) _{aA}	2(28,6) _{aA}	0(0,0) _{aA}	7
Vivo	44(73,3) _{aB}	8(13,3) _{aA}	6(10,0) _{aA}	2(3,3) _{aA}	60

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 7 - Distribuição das áreas de necrose segundo a avaliação do filhote ao nascimento

Áreas de Necrose				
	Ausente	Discreto	Moderado	TOTAL
Morto	3(23,1) _{aA}	4(30,8) _{aA}	6(46,2) _{aA}	13
Natimorto	2(28,6) _{aA}	3(42,9) _{aA}	2(28,6) _{aA}	7
Vivo	28(46,7) _{aB}	22(36,7) _{aAB}	10(16,7) _{aA}	60

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 8 - Distribuição das áreas de inflamação segundo a avaliação do filhote ao nascimento

Áreas de Inflamação				
	Ausente	Discreto	Moderado	TOTAL
Morto	11(84,6) _{aB}	1(7,7) _{aA}	1(7,7) _{aA}	13
Natimorto	4(57,1) _{aB}	3(42,9) _{aAB}	0(0,0) _{aA}	7
Vivo	48(80,0) _{aB}	8(13,3) _{aA}	4(6,7) _{aA}	60

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 9 - Distribuição das áreas de calcificação segundo a avaliação do filhote ao nascimento

Áreas de Calcificação				
	Ausente	Discreto	Moderado	TOTAL
Morto	1(7,7) _{aA}	6(46,2) _{aA}	6(46,2) _{aA}	13
Natimorto	1(14,3) _{aA}	3(42,9) _{aA}	3(42,9) _{aA}	7
Vivo	11(18,3) _{aA}	25(41,7) _{aA}	24(40,0) _{aA}	60

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 10 - Distribuição das áreas de hematoma marginal segundo a avaliação do filhote ao nascimento

Áreas de Hematoma Marginal					
	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado	TOTAL
Morto	2(15,4) _{aB}	6(46,2) _{aA}	4(30,8) _{aA}	1(7,7) _{aA}	13
Natimorto	0(0,0) _{aA}	2(28,6) _{aA}	3(42,9) _{aA}	2(28,6) _{aA}	7
Vivo	0(0,0) _{aA}	18(30,0) _{aBC}	35(58,3) _{aA}	7(11,7) _{aA}	60

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 11 - Distribuição das áreas de hemorragia segundo o sexo do filhote

Áreas de Hemorragia					
	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado	TOTAL
Fêmea	30(71,4) _{aB}	5(11,9) _{aA}	6(14,3) _{aA}	1(2,4) _{aA}	42
Macho	25(65,8) _{aB}	8(21,1) _{aA}	4(10,5) _{aA}	1(2,6) _{aA}	38

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 12 - Distribuição das áreas de necrose segundo o sexo do filhote

Áreas de Necrose				
	Ausente	Discreto	Moderado	TOTAL
Fêmea	16(38,1) _{aA}	14(33,3) _{aA}	12(28,6) _{aA}	42
Macho	17(44,7) _{aA}	15(39,5) _{aA}	6(15,8) _{aA}	38

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 13 - Distribuição das áreas de inflamação segundo o sexo do filhote

Áreas de Inflamação				
Ausente	Discreto	Moderado	TOTAL	
Fêmea	36(85,7) _{aB}	59(11,9) _{aA}	1(2,4) _{aA}	42
Macho	27(71,1) _{aB}	7(18,4) _{aA}	4(10,5) _{aA}	38

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 14 - Distribuição das áreas de calcificação segundo o sexo do filhote

Áreas de Calcificação				
Ausente	Discreto	Moderado	TOTAL	
Fêmea	7(16,7) _{aA}	18(42,9) _{aB}	17(40,5) _{aB}	42
Macho	6(15,8) _{aA}	16(42,1) _{aB}	16(42,1) _{aB}	38

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 15 - Distribuição das áreas de hematoma marginal segundo o sexo do filhote

Áreas de Hematoma Marginal					
	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado	TOTAL
Fêmea	1(2,4) _{aB}	12(28,6) _{aBC}	22(52,4) _{aC}	7(16,7) _{aB}	42
Macho	1(2,6) _{aA}	14(36,8) _{aB}	20(52,6) _{aB}	3(7,9) _{aA}	38

a,b: comparação de grupos fixada a categoria de resposta

A,B: comparação das categorias de resposta dentro do grupo

Anexo 16 - Normas para publicação na Revista Brasileira de Reprodução Animal

A **Revista Brasileira de Reprodução Animal (RBRA)** destina-se à publicação de artigos científicos, revisões (compilação de informação da literatura, demonstrando análise crítica sobre o tema e com características de excepcionalidade, a juízo do Corpo Editorial), comunicações e relatos de casos, capazes de contribuir, significativamente, para um melhor conhecimento dos fenômenos ligados à reprodução animal, bem como para a divulgação da produção científica da área.

A RBRA, a partir do v.29 de 2005, é publicada exclusivamente *on line* e está disponível no *website* do CBRA (<http://www.cbra.org.br>).

Toda correspondência deverá ser encaminhada a:
Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrosio, Editor Chefe
Revista Brasileira de Reprodução Animal
E-mail : rbra@cbra.org.br

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA)
Av. Cel José Dias Bicalho 1224, Lj 4, Bairro São Luiz, Pampulha, CEP 31275-050, Belo Horizonte, MG
Fone: (31)3491-7122; Fax: (31)3491-7025.
E-mail : cbra@cbra.org.br e *Website*: <http://www.cbra.org.br>

1. POLÍTICA EDITORIAL

Os artigos submetidos à RBRA serão preliminarmente avaliados quanto às normas e a adequação ao escopo da Revista. Somente os artigos aprovados nesta etapa serão encaminhados para a análise do mérito científico por consultores *ad hoc*.

2. TIPOS DE ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

- Artigo científico: é o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de resultados inéditos e posteriores ao planejamento da pesquisa.
- Revisão: análise e discussão do que há disponível na literatura científica e técnica atual sobre um determinado tema. As informações devem ser organizadas de maneira lógica e atrativa, com o objetivo de facilitar ao leitor o acompanhamento da evolução do assunto. As conclusões referem-se ao conjunto dos artigos revistos.
- Comunicação: é o relato sucinto de resultados de um trabalho científico adequadamente planejado.
- Relato de caso: é o relato de um caso raro, de forma completa e de interesse da clínica médico-veterinária.

3. NORMAS GERAIS

- Os artigos devem ser originais e destinados exclusivamente à publicação na RBRA.
- Os autores são responsáveis pelos resultados, pelos conceitos e pelas informações contidas nos artigos.
- A redação do artigo deverá estar de acordo com a lexicologia e sintaxe do idioma português. Para ortografia em português, adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua

Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras. Para ortografia em inglês, recomenda-se o Webster's Third New International Dictionary.

- As unidades de medida devem ser usadas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades. As abreviaturas e os símbolos devem ser evitados, exceto quando forem usadas unidades padrão de medidas.
- Os artigos submetidos a aprovação deverão estar em consonância com as normas descritas no capítulo "Preparação do para submissão".

Submissão dos artigos

Os artigos devem ser encaminhados exclusivamente, para o e-mail <rabra@cbra.org.br>. As ilustrações devem ser enviadas em arquivo separado.

Taxa de submissão

A taxa de submissão de R\$50,00 (cinquenta reais) por artigo deverá ser depositada na conta **Banco Itaú, Agência 3179, conta corrente 08080-3**, por meio de depósito identificado. Uma cópia do comprovante deverá ser encaminhada ao CBRA, via e-mail, juntamente com o artigo submetido. O artigo somente será encaminhado para avaliação se comprovada a quitação do pagamento da taxa de submissão. A taxa de submissão não será devolvida.

Taxas de publicação

O artigo recomendado só será publicado mediante o pagamento prévio da taxa de R\$70,00 (setenta reais) por página publicada, a qual será cobrada do autor indicado para correspondência. O valor total deverá ser depositado na conta **Banco Itaú, Agência 3179, conta corrente 08080-3**, por meio de depósito identificado, e uma cópia do comprovante deverá ser encaminhada ao CBRA, via e-mail.

4. PREPARAÇÃO DO TRABALHO PARA SUBMISSÃO

Texto e formato dos arquivos: o artigo deve ser digitado em folha A4 (21.0 x 29.7) com 3 cm de margem, fonte *Times New Roman* 12, espaço entrelinhas duplo, com linhas numeradas consecutivamente e paginadas sequencialmente. O arquivo eletrônico deverá ser compatível com *Word for Windows*.

Tamanho do artigo: O artigo submetido, incluindo as ilustrações e as referências, deverá apresentar no máximo 15 páginas (artigo de revisão), 15 páginas (artigo científico), 05 páginas (relato de caso) e 05 páginas (comunicação).

Seções de um manuscrito científico

Artigo científico: Título; Título em inglês; Autor (es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; *Abstract*; *Keywords*; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão (ou Resultados e Discussão); Conclusões; Agradecimentos; Referências; Ilustrações. O artigo científico deve conter no máximo 30 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados. (ver detalhes abaixo).

Artigo de revisão: Título; Título em inglês; Autor(es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; *Abstract*; *Keywords*; Introdução; Desenvolvimento do assunto (organizado em partes com títulos próprios e, eventualmente, subtítulos); Considerações finais; Agradecimentos; Referências; Ilustrações. As referências devem conter no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Comunicação : Mesma estrutura do artigo científico, de forma sucinta, mas sem subtítulos. A comunicação deve conter no máximo 10 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Relato de caso: Título; Título em inglês; Autor(es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; *Abstract*; *Keywords*; Introdução; Metodologia diagnóstica utilizada; Resultados e Considerações finais; Referências, Ilustrações. O relato de caso deve conter no máximo 10 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Descrição das seções de um artigo científico (os demais tipos de manuscritos devem se adaptar ao modelo):

- **Título:** O título deve ser sucinto, mas representativo do conteúdo do artigo. Apenas a primeira palavra do título com a inicial em maiúscula (exceção para nomes próprios). A citação de suporte financeiro deverá ser colocada junto dos agradecimentos, antes da lista de referências.
- **Título em inglês:** Logo abaixo do título em português, versão em inglês do título em português.
- **Autor(es):** Os nomes dos autores virão abaixo dos títulos em português e inglês, na ordem direta, prenomes e nomes intermediários representados pela inicial seguida de ponto, seguidos dos sobrenomes paternos por extenso. A afiliação de cada autor deverá ser indicada por algarismos arábicos sobrescritos no final do sobrenome.
- **Afiliação(ões):** Deve ser citada somente a instituição principal e um segundo nível de filiação, quando da execução do trabalho submetido, seguida da cidade, estado e país. Não citar título, cargo e função. O autor para correspondência deve ser indicado com endereço completo, telefone, fax e e-mail.
- **Resumo:** Narrativa sucinta dos objetivos, material e métodos (quando pertinente), principais resultados e conclusões, limitado a 200 palavras (1374 caracteres com espaço) em um só parágrafo.
- **Palavras-chave:** Palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo, não ultrapassando o limite de cinco.
- **Abstract:** Versão em inglês do Resumo.
- **Keywords:** Versão em inglês das Palavras-chave.
- **Introdução:** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.
- **Material e Métodos:** Devem ser citados o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. É recomendado o uso restrito de subtítulos. Nos artigos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados, deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.
- **Resultados:** Devem ser apresentados clara e objetivamente os principais resultados encontrados.
- **Discussão:** Devem ser discutidos somente os resultados obtidos no trabalho.
- **Conclusões:** As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.
- **Agradecimentos:** Devem ser concisamente expressados.
- **Referências:** Referenciar somente artigos citados e publicados. As referências devem ser listadas em ordem alfabética do(s) sobrenome(s) do(s) autor(es) e a seguir do título.
- **Ilustrações:** Compreende as tabelas e as figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data), e a

correspondente referência deve figurar na lista final. Recomendações: 1) Ilustrações idênticas ao original: os autores devem encaminhar à RBRA a autorização do autor ou detentor dos direitos autorais para reprodução. No artigo, além da identificação da fonte, os autores devem mencionar a autorização nos agradecimentos; 2) Ilustrações adaptadas ou modificadas: os autores devem identificar a fonte, acrescentando a informação "adaptado de ...".

Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos organizados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais apenas na separação do cabeçalho e ao final da tabela. A separação de grupos de dados no corpo da tabela deverá ser feita inserindo-se uma linha em branco. A legenda, colocada acima da tabela, recebendo inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico, e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura: Refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda deverá ser colocada abaixo da ilustração, recebendo inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico, e é referida no texto como Fig., mesmo quando se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.tif, com alta resolução.

5. NORMAS PARA CITAÇÃO NO TEXTO E REDAÇÃO DE REFERÊNCIAS

Citação de referência no texto

A citação no texto será feita segundo as circunstâncias, podendo o(s) autor(es) e as data(s) ser(em) citado(s) entre parênteses, ou somente a data. No caso de citação de diversos autores, listar cronologicamente e, havendo coincidência de data, usar a ordem alfabética de autor. Exemplo: Dunne (1967), Morril (1967), Nutrient... (1968), Lopes e Moreno (1974) Ferguson et al. (1979), OU (Dunne, 1967; Morril, 1967; Nutrient..., 1968; Lopes e Moreno, 1974; Ferguson et al., 1979).

Referências

São adotadas as normas da ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos abaixo. Para documentos não exemplificados usar a norma original (www.abnt.org.br).

Periódicos

Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, v.48, 1987/88. p.351.

Ferguson JA, Reeves WC, Hardy JL . Studies on Immunity to alphaviruses in foals.*Am J Vet Res*, v.40, p.5-10, 1979.

Holenweger JA, Tagle R, Waserman A, Schim FA, Franckel S . Anestesia geral del canino. *Not Med Vet* , n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

Dunne HW lang=EN-US (Ed.). lang=ES-TRAD *Enfermedades del cerdo* lang=ES-TRAD . México: UTEHA, 1967.

Lopes CAM, Moreno G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 14, 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: CBMV, 1974. p.97. Resumo.

Morril CC. Infecciones por clostrídios. In: Dunne HW (Ed.). lang=ES-TRAD *Enfermedades del cerdo* lang=ES-TRAD . México: UTEHA, 1967. lang=ES-TRAD p.400-415.

Nutrient requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. p.19-20.

Silva NQ. *Peri-tonioscopia na égua*. 1971. 38f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1971.

Documentos eletrônicos

Documento publicado disponibilizado em meio eletrônico

Arranjo tributário. *Diário do Nordeste On Line*, Fortaleza, 27. nov. 1998. Disponível em <http://www.diariodonordeste.com.br>. Acesso em 28 nov. 1998.

Guncho MR. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: Seminário de Bibliotecas Universitárias, 10, 1998, Fortaleza. *Anais ...* Fortaleza: Tec Treina, 1998. CD-ROM.

Política. In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática, 1998. Disponível em <http://www.priberam.pt/dIDPLO>. Acesso em 8 mar. 1999.

Quality food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critcal6.htm>>. Acesso em: 27 abr. 2000.

Silva RN, Oliveira R. Os limites pedagógicos do paradigma style='letter-spacing:.2pt'>da qualidade total na educação. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPe, 4, 1996, Recife. *Anais eletrônicos ...* Recife: UFPe, 1996. Disponível em <http://www.prospeq.ufpe.br/anais/anais/educ/ce04.htm>. Acesso em 21 jan. 1997.

Documento de acesso exclusivo em meio eletrônico

Birds from Amapá; banco de dados. Disponível em <http://www.bdt.org/bdt/avifauna/aves>. Acesso em 25 nov. 1998.

Bioline Discussion List. List maintained by the Bases de Dados Tropical, BDT, in Brasil. Disponível em: lisserv@bdt.org.br. Acesso em 25 nov. 1998.

Civitas. Coordenação de Simão Pedro Marinho. Desenvolvido pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 1995-1998. Apresenta textos sobre urbanismo e desenvolvimento de cidades. Disponível em: [gcsnet.com.br/oamis/ civitas](http://gcsnet.com.br/oamis/civitas)>. Acesso em 27 nov. 1998.

Citação de citação

Devem ser evitadas. Somente a obra consultada no original deverá aparecer na lista de referências. No texto, serão citados o autor e a data do documento original, seguido da expressão "citado por" e do autor e data da obra consultada.

Artigos no prelo

Incluir na lista de referências apenas os artigos já aceitos para publicação. Após a referência, colocar a informação "No prelo". Os artigos apenas submetidos entram na categoria "Informação pessoal".

Informação pessoal

Os dados obtidos por informação oral (palestras, debates, artigos submetidos e em fase de análise, comunicação pessoal etc.) são identificados apenas no texto. Após a informação, coloca-se o autor, a data, instituição do autor e a expressão "Informação pessoal".

6. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Não serão fornecidas separatas. Os artigos são disponibilizados no formato pdf, no endereço eletrônico da revista (www.cbpa.org.br).

A reprodução e a tradução de qualquer artigo para fins comerciais são proibidas, sendo que transcrição em outras revistas científicas deve ser precedida de anuência do editor.

Anexo 17 - Aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

fmvz - unesp

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu**A T E S T A D O**

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Análise histológica e imunoistoquímica da placenta proveniente de parto eutócico em cadelas**" Protocolo nº 129/2013-CEUA, de **Isadora Frazon Costa**, desta Faculdade, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 13 de setembro de 2013.

Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu