

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA CÉRVIX DE CADELAS
SAUDÁVEIS E COM DIAGNÓSTICO DE PIOMETRA

RODRIGO VOLPATO

Botucatu-SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA CÉRVIX DE CADELAS
SAUDÁVEIS E COM DIAGNÓSTICO DE PIOMETRA

RODRIGO VOLPATO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Botucatu, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Tit. Maria Denise Lopes

Botucatu-SP

2015

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

Volpato, Rodrigo.

Avaliação imunoistoquímica da cérvix de cadelas saudáveis e com o diagnóstico de piometra / Rodrigo Volpato. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Maria Denise Lopes

Capes: 50504002

1. Cão - Reprodução. 2. Útero - Infecções. 3. Piometra.
4. Imuno-histoquímica.

Palavras-chave: cadela; imunoistoquímica; piometra.

Nome do autor: Rodrigo Volpato

Título: Avaliação imunoistoquímica da cérvix de cadelas saudáveis e com diagnóstico de piometra

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Tit. Maria Denise Lopes

Presidente e orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu

Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu

Profa. Dra. Eunice Oba

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu

Prof. Dr. Daniel Bartoli de Sousa

Departamento de Morfofisiologia

Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí

Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins

Departamento de Clínicas Médicas

Universidade Estadual de Londrina, Campus de Londrina.

Data da Defesa: 21 de janeiro de 2015

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a **Deus** e a **minha família**.

Aos meus pais, **Antônio Carlos** e **Roselene**, por todo amor e apoio dedicado. Desejo ter sido merecedor de tanto esforço e um dia poder retribuir o muito que fizeram por mim.

Aos meus irmãos, **Andressa** e **Gustavo**, espelhos de respeito e orgulho, por dividirem comigo vitórias e derrotas.

A minha nova família **Mi e J.P.**, se hoje me esforço por novas conquistas, é pensando em nós três. Hoje minha vitória é a vitória da “família buscapé” e a derrota de qualquer um de vocês é a minha derrota. Juntos estamos trilhando o caminho do nosso futuro e vamos alcançar o nosso sucesso.

Ao **Jim** (*in memoriam*). Diante de tantas conquistas, 2014 me trouxe a maior perda que já tive na vida. Parece que foi ontem que entrei numa casa desconhecida e caminhei até os fundos. Parece que foi ontem que vi sair correndo do canil uma bolinha chocolate e me apaixonei. Parece que foi ontem que te carregava para todo lugar, pois ainda conseguia carregá-lo. Psicólogos diriam que não podemos depositar tanto amor, tanta dependência em um cão, afinal...é só um cão. É só um cão para os leigos que não sabem falar com eles, escuta-los e, principalmente, aprender. Para mim, o meu cachorro representava a confiança, o amor incondicional, o companheirismo e uma pureza que nenhum ser humano jamais irá atingir. Pessoas entraram e saíram da minha vida, mas ele sempre permaneceu comigo. Incontáveis momentos de alegrias, só não mais incontáveis que as coisas destruídas por ele. Incontáveis momentos de tristezas, mas nenhum maior que vê-lo velhinho e no fim da vida. Quanta raiva passei saindo para o trabalho e ele pulando e marcando as patas na minha roupa, mas no final, apenas chorava deitado e abanava o rabo quando eu chegava ou saía, a alegria em me ver sempre foi a mesma, mas dessa vez, era eu quem caminhava em sua direção e não mais ele na minha. Se ele pudesse me compreender por um minuto gostaria apenas dizer que nada na minha vida foi mais maravilhoso que a nossa convivência, não existe nada que eu possa fazer para chegar nem perto de retribuir o que foi feito por mim. Jim meu amor e gratidão serão eternos.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Uma etapa muito importante da minha vida chega ao fim. Muitas pessoas me apoiaram e contribuíram para mais essa vitória. Para todas essas pessoas, muito obrigado!

Agradeço imensamente minha orientadora **Profa. Titular Maria Denise Lopes** pela orientação, dedicação, ensinamentos e amizade. A senhora fez parte de todo o processo da minha vida profissional, nossa convivência teve início na graduação, passamos pelo mestrado e hoje ao término do doutorado tenho apenas agradecimentos a fazer. O meu agradecimento escrito num papel fica muito aquém de tudo de bom que a senhora fez por mim. Muito obrigado !!!

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu por minha formação acadêmica e a CAPES pela concessão de bolsa de estudo e financiar minha vivência e aprendizado em Botucatu.

Ao Departamento de Reprodução Animal e a todos os docentes pelos ensinamentos e convivência, em especial ao Prof. João Carlos P. Ferreira (e seu orientado Eduardo Trevisol) por permitir que eu utilizasse alguns de seus receptores. A Seção de Pós-graduação pela oportunidade concedida.

Aos amigos de república, agregados, companheiros de churrascos e futebol. Não só de estudo se constrói o caráter e a personalidade de um homem. Obrigado Alemão, Duroc, Hugo, Filão, Léo, Ademir, Braxola, Duvéio, Krenato.

Aos amigos do REPAS, Guta, Camila, Carlos Renato, Fabiane, Paulinha, Lucas, Carla, Carmem, Gabi, pelo convívio diário, oportunidades de pesquisas, viagens e aprendizados. Valeu galera!!!

A toda equipe do Hospital Veterinário Animal Center e da Clínica Veterinária Arca de Noé por acreditarem e confiarem no meu trabalho.

Aos velhos amigos de Itu, amigos de anos, décadas e de hoje, Cristovão, Marquinho, Torto, Ferdi, Bel, Júlio, Na e Milinha. Mesmo ficando anos sem nos falarmos, quando nos reunimos e contamos nossas lembranças não parecem histórias, parecem a saída do final de semana.

A Dona Emília e ao Sr. Luiz , por me receberem tão bem em sua família, pelos ótimos momentos de descontração e por me lembrarem da importância da pós graduação. Que esse seja o início de uma longa convivência.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“A compaixão pelos animais está tão ligada com a
bondade de caráter, que se pode afirmar que
quem é cruel com os animais não pode ser bom.”

Arthur Schopenhauer

LISTA DE TABELAS

- TABELA 01:** Valores das dosagens séricas de progesterona (ng/mL) dos animais dos grupos piometra aberta (PA), piometra fechada (PF), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....30
- TABELA 02:** Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de e-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....31
- TABELA 03:** Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de e-NOS no epitélio luminal (e-NOS_luminal), região glandular (e-NOS_glandular) e região muscular (e-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....31
- TABELA 04:** Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de e-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....32
- TABELA 05:** Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de e-NOS no epitélio luminal (e-NOS_luminal), região glandular (e-NOS_glandular) e região muscular (e-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....32
- TABELA 06:** Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de e-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....33

TABELA 07: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de e-NOS no epitélio luminal (e-NOS_luminal), região glandular (e-NOS_glandular) e região muscular (e-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....33

TABELA 08: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de e-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....34

TABELA 09: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de e-NOS no epitélio luminal (e-NOS_luminal), região glandular (e-NOS_glandular) e região muscular (e-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....34

TABELA 10: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de i-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....36

TABELA 11: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de i-NOS no epitélio luminal (i-NOS_luminal), região glandular (i-NOS_glandular) e região muscular (i-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....36

TABELA 12: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de i-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....37

TABELA 13: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de i-NOS no epitélio luminal (i-NOS_luminal), região glandular (i-NOS_glandular) e região muscular (i-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....37

TABELA 14: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de i-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....38

TABELA 15: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de i-NOS no epitélio luminal (i-NOS_luminal), região glandular (i-NOS_glandular) e região muscular (i-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....38

TABELA 16: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de i-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....39

TABELA 17: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de i-NOS no epitélio luminal (i-NOS_luminal), região glandular (i-NOS_glandular) e região muscular (i-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....39

TABELA 18: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de FAS na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....41

TABELA 19: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores FAS no epitélio luminal (FAS_luminal), região glandular (FAS_glandular) e região muscular (FAS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....41

TABELA 20: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....42

TABELA 21: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS no epitélio luminal (FAS_luminal), região glandular (FAS_glandular) e região muscular (FAS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....42

TABELA 22: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de FAS na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....43

TABELA 23: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de FAS no epitélio luminal (FAS_luminal), região glandular (FAS_glandular) e região muscular (FAS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....43

TABELA 24: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....44

TABELA 25: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS no epitélio luminal (FAS_luminal), região glandular (FAS_glandular) e região muscular (FAS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....44

TABELA 26: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de FAS-L na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....46

TABELA 27: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores FAS-L no epitélio luminal (FAS-L_luminal), região glandular (FAS-L_glandular) e região muscular (FAS-L_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....46

TABELA 28: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS-L na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....47

TABELA 29: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS-L no epitélio luminal (FAS-L_luminal), região glandular (FAS-L_glandular) e região muscular (FAS-L_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....47

TABELA 30: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de FAS-L na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....48

TABELA 31: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de FAS-L no epitélio luminal (FAS-L_luminal), região glandular (FAS-L_glandular) e região muscular (FAS-L_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....48

TABELA 32: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS-L na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....49

TABELA 33: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS-L no epitélio luminal (FAS-L_luminal), região glandular (FAS-L_glandular) e região muscular (FAS-L_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....49

TABELA 34: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de PGF2 α -R na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....51

TABELA 35: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores PGF2 α -R no epitélio luminal (PGF2 α -R_luminal), região glandular (PGF2 α -R_glandular) e região muscular (PGF2 α -R_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....51

TABELA 36: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de PGF2 α -R na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....52

TABELA 37: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de PGF2 α -R no epitélio luminal (PGF2 α -R_luminal), região glandular (PGF2 α -R_glandular) e região muscular (PGF2 α -R_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....52

TABELA 38: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de PGF2 α -R na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....53

TABELA 39: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de PGF2 α -R no epitélio luminal (PGF2 α -R_luminal), região glandular (PGF2 α -R_glandular) e região muscular (PGF2 α -R_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....53

TABELA 40: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de PGF2 α na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....54

TABELA 41: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de PGF2 α -R no epitélio luminal (PGF2 α -R_luminal), região glandular (PGF2 α -R_glandular) e região muscular (PGF2 α -R_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....54

TABELA 42: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de COX-2 na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....56

TABELA 43: Valores medianos do escore considerados positivos (imunomarcados) para receptores COX-2 no epitélio luminal (COX-2_luminal), região glandular (COX-2_glandular) e região muscular (COX-2_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....56

TABELA 44: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de COX-2 na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....57

TABELA 45: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de COX-2 no epitélio luminal (COX-2_luminal), região glandular (COX-2_glandular) e região muscular (COX-2_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.....57

TABELA 46: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de COX-2 na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 201558

TABELA 47: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de COX-2 no epitélio luminal (COX-2_luminal), região glandular (COX-2_glandular) e região muscular (COX-2_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....58

TABELA 48: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de COX-2 na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....59

TABELA 49: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de COX-2 no epitélio luminal (COX-2_luminal), região glandular (COX-2_glandular) e região muscular (COX-2_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.....59

TABELA 50: Comparação da positividade (presença) entre os grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF) e entre os grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL) de todos os receptores estudados (e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2). Botucatu, 2015.....61

TABELA 51: Comparação da intensidade (concentração) entre os grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF) e entre os grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL) de todos os receptores estudados (e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2). Botucatu, 2015.....62

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Detecção imunoistoquímica, sendo considerados citoplasmas positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. “A” receptores de e-NOS no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de e-NOS no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de e-NOS na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de e-NOS na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de e-NOS na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de e-NOS na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.....35

Figura 02: Detecção imunoistoquímica, sendo considerados citoplasmas positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. “A” receptores de i-NOS no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de i-NOS no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de i-NOS na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de i-NOS na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de i-NOS na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de i-NOS na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.....40

Figura 03: Detecção imunoistoquímica, sendo considerados citoplasmas positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. “A” receptores de FAS no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de FAS no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de FAS na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de FAS na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de FAS na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de FAS na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.....45

Figura 04: Detecção imunoistoquímica, sendo considerados citoplasmas positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. “A” receptores de FAS-L no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de FAS-L no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de FAS-L na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de FAS-L na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de FAS-L na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de FAS-L na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.....50

Figura 05: Detecção imunoistoquímica, sendo considerados citoplasmas positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. “A” receptores de PGF2 α -R no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de PGF2 α -R no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de PGF2 α -R na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de PGF2 α -R na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de PGF2 α -R na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de PGF2 α -R na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.....55

Figura 06: Detecção imunoistoquímica, sendo considerados citoplasmas positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. “A” receptores de COX-2 no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de COX-2 no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de COX-2 na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de COX-2 na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de COX-2 na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de COX-2 na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.....60

Figura 7: Fluxograma com a hipótese da interferência dos receptores estudados (e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2) na cascata que leva a abertura cervical. Adaptado de NUNES et al., 1999; BARBAS et al., 2001; KELLY, 2002; LERMA et al., 2008; CHATDARONG et al., 2010; KUNKITTI et al., 2011; TAMADA et al., 2012; KAUFMANN et al., 2012; HANSFORD et al., 2013; GOLBERG, 2014.....67

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT.....	
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	05
2.1. Objetivo Geral.....	06
2.2. Objetivo Específico.....	06
3. Revisão de Literatura.....	07
3.1. Fisiologia do ciclo estral.....	08
3.2. Mecanismos envolvidos na abertura cervical.....	09
3.2.1. Dosagem sérica de estrógenos e progesterona e receptores de estrógenos e progesterona.....	11
3.2.2. Colágenos I e III.....	13
3.2.3. Óxido Nítrico.....	14
3.2.4. FAS/FAS-L.....	16
3.2.5. Prostaglandinas.....	17
3.2.6. Ciclo-Oxigenase.....	19
4. Material e Métodos.....	21
4.1. Dosagem sérica de progesterona	22
4.2. Análise imunoistoquímica.....	23
4.3. Análise estatística	27
5. Resultados.....	29
5.1. Dosagem sérica de progesterona.....	30
5.2. Imuno-histoquímica.....	31
5.2.1. Receptores e-NOS	31
5.2.2. Receptores i-NOS.....	36
5.2.3. Receptores FAS.....	41
5.2.4. Receptores FAS-L.....	46
5.2.5. Receptores PGF2 α -R.....	51
5.2.6. Receptores COX-2.....	56
5.2.7. Resumo das comparações entre os grupos estudados	61

6. Discussão.....	63
7. Conclusão.....	77
8. Referências.....	79
9.Trabalho científico 1.....	95
10.Trabalho científico 2.....	133

Resumo

VOLPATO, R. Avaliação imunohistoquímica da cérvix de cadelas saudáveis e com diagnóstico de piometra. Botucatu, 2015. 149p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar os mecanismos envolvidos na abertura cervical em cadelas saudáveis e com o diagnóstico piometra. Para tanto, foram realizadas avaliações imunohistoquímicas em diferentes regiões da cérvix: epitélio luminal, região glandular e região muscular, para os receptores e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2. Foram utilizadas 11 cadelas com piometra aberta, 11 cadelas com piometra fechada, 6 cadelas saudáveis em fase folicular e 6 em fase luteal do ciclo estral. Todas as fêmeas foram submetidas a ovariectomia (OSH) e dosagens de progesterona foram realizadas para confirmação da fase do ciclo estral. As dosagens foram realizadas utilizando-se kits comerciais em fase sólida. Para avaliar a imunomarcação foram utilizados dois métodos. No primeiro, em cada um desses tecidos foram avaliados cinco campos, cada campo recebeu um escore de 0 a 4 (sendo 0 = 0 a 5% do campo positivo, 1 = 5 a 25% do campo positivo, 2 = 25 a 50%, 3 = 50 a 75% do campo positivo e 4 = 75 a 100% do campo positivo) sendo considerados positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. No segundo método a intensidade das marcações foi avaliada de forma subjetiva em fraca, moderada e forte, recebendo respectivamente escore 1, 2 e 3 para a análise estatística. As leituras foram realizadas em cinco campos aleatórios, sendo todos os campos homogêneos (mais de 80% da colora o com a mesma intensidade). As avaliações foram realizadas em um microscópio de luz no aumento 400 vezes. Foram realizados os testes estatísticos não-paramétrico de Mann-Whitney para comparar a presença, a concentra o de cada receptor e a região entre os grupos piometra fechada e aberta. Entre os grupos piometra, fase luteal e fase folicular, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis, pois a compara o foi realizada entre 3 grupos independentes. Os receptores i-NOS e FAS comportam-se da mesma maneira em cadelas com piometra

aberta e fechada, não estando envolvidos no mecanismo de abertura cervical nessa doença. Os receptores e-NOS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2 foram encontrados em maior quantidade no grupo piometra aberta, sugerindo o envolvimento no mecanismo de abertura cervical. Os receptores i-NOS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2 não se mostraram diferentes nos grupos piometra, cadelas saudáveis em fase folicular e em fase luteal, sugerindo sua independência hormonal nas cadelas. O receptor e-NOS foi superior nas cadelas com piometra quando comparados aos grupos de cadelas saudáveis em fase folicular e em fase luteal, podendo estar correlacionado a presença de infiltrado inflamatório. O receptor FAS foi inferior no grupo de cadelas saudáveis em fase folicular quando comparado as cadelas com piometra e cadelas saudáveis em fase luteal, podendo estar relacionado a concentração de progesterona e ser ciclo dependente. Os resultados obtidos mostram a importância do assunto e a dificuldade de se demonstrar com clareza o mecanismo de controle da abertura cervical em cadelas.

Palavras-chave: cadela, piometra, imunoistoquímica

Abstract

VOLPATO, R. Cervix immunohistochemical evaluation of healthy bitches and bitches diagnosed with pyometra. Botucatu, 2015. 149p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the mechanisms involved in cervical opening in bitches with pyometra and healthy bitches. To this end, immunohistochemical evaluations were conducted in different regions of the cervix, epithelium luminal, glandular and musculene for e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R and COX-2 receptors. For this purpose, were used 11 bitches with open pyometra, 11 bitches with close pyometra, 6 healthy bitches on follicular phase and 6 on luteal phase of the estrous cycle. All females were subjected to ovariohysterectomy (OSH) and serum progesterone were performed to confirm the phase of the estrous cycle. The measurements were performed using solid phase commercial kits. For immunostaining evaluation two methods were used. In the first, five fields were evaluated in each of these tissues, where each field received a score from 0 to 4 (0 = 0 to 5% of positive field, 1 = 5 to 25% of positive field, 2 = 25 to 50%, 3 = 50 to 75% of positive field and 4 = 75 to 100% of positive field) being considered positive those stained in brown and blue the negative ones. In the second method the markings intensity was assessed subjectively in weak, moderate and strong, respectively receiving scores 1, 2 and 3 for statistical analysis. Readings were taken at five random fields, that were all homogeneous (more than 80% of the staining with the same intensity). The evaluations were performed using a light microscope at a magnification of 400x. Non-parametric statistical test of Mann-Whitney was performed to compare the presence, concentration of each receiver and the region between the closed and open pyometra groups. Among pyometra, follicular phase and luteal phase groups, Kruskal-Wallis test was used, once the comparison made was between three independent groups. The i-NOS and FAS receptors behave in the same way in bitches with open and closed pyometra, not being involved in cervical opening mechanism in this disease. The e-NOS, FAS-L, PGF2 α -R and COX-2 receptors were found in major quantities in the open pyometra group, suggesting involvement in the cervical opening mechanism. The i-NOS, FAS-L, PGF2 α -R and COX-2 receptors did not differ in pyometra, healthy bitches, bitches on follicular phase and on luteal phase groups, suggesting hormonal independence in bitches. The e-NOS receptor was higher in bitches with pyometra when compared with healthy bitches, bitches on follicular phase and on luteal phase

groups, may be correlated to the presence of inflammatory infiltrate. The FAS receptor was lower in healthy bitches group on follicular phase compared with pyometra bitches and healthy bitches on luteal phase, may be related to progesterone and being cycle dependent. The obtained results show the importance of this topic and the difficulty in clearly demonstrate the controlling mechanism of cervical opening in bitches

Keywords: bitches, pyometra, immunohistochemistry

Introdução

1. INTRODUÇÃO

No Brasil existe uma grande população de cadelas com risco de desenvolver um quadro de piometra, pois apenas uma pequena porcentagem de cadelas sadias é normalmente submetida à ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva. A maioria das castrações em nossa rotina é realizada como consequência de alterações clínicas. A situação é diferente em outros países mais desenvolvidos onde a prática da castração é comum e realizada em mais de 85% das cadelas (HAGMAN et al., 2009).

Em países onde a castração de cães saudáveis não é geralmente realizada, a piometra é uma das doenças mais comuns e afeta mais de 50% de todas as cadelas antes dos 10 anos de idade. A piometra afeta principalmente fêmeas de meia-idade e idosos, mas tem sido relatada em animais com idades variando de 4 meses a 18 anos, com uma idade média para o diagnóstico de 6 a 8 anos (EGENVALL et al., 2001; HAGMAN, 2012).

A patogênese da piometra canina não é completamente esclarecida, a despeito de décadas de estudo sobre a etiologia desta doença. O conceito de Síndrome Hiperplasia Endometrial Cística/Piometra introduzido por Dow (1957; 1958), sugere que mudanças hormonais são responsáveis por um quadro de hiperplasia endometrial cística (HEC) que tornam o útero mais susceptível a infecção bacteriana secundária. Dow (1958) e Sandholm et al. (1975) propuseram que a endometrite subaguda é seguida pela HEC, a qual predispõe a piometra.

Atualmente é reconhecido que o desequilíbrio hormonal primário ou uma resposta anormal as concentrações normais de estrôgenos e progesterona afetam as células do epitélio do útero e facilitam a adesão, colonização e crescimento de bactérias (FIENI et al., 2014). A resposta ao estrógeno seguida por longos períodos de predominância da progesterona causam modificações hormonais que afetam o endométrio que juntamente com uma infecção bacteriana, pode resultar em uma síndrome clínica descrita como piometra (TAMADA et al., 2012; CHANDRAPURIA e SOMIL, 2014).

A piometra pode se apresentar de forma aberta ou fechada, caracterizada pela presença ou ausência de secreção vaginal, respectivamente. Os sinais clínicos variam conforme o tempo de evolução do

processo e o grau de relaxamento da cérvix. Cadelas com piometra aberta, geralmente, apresentam um menor comprometimento do seu estado geral do que cadelas apresentando piometra fechada (BYERS et al., 2007).

A taxa de sucesso global de tratamento médico para piometra relatada nos estudos varia de 83% a 100%. O sucesso maior é sempre em cadelas com cérvix aberta em comparação com as fechadas. A taxa de recorrência varia de 27% a 48% (METCALFE e VISCHER, 2006; JURKA et al., 2010; ROS et al., 2014). O entendimento do mecanismo de abertura e fechamento cervical sem dúvida auxiliaria em melhores resultados nos tratamentos medicamentosos.

A cérvix é considerada uma barreira física importante prevenindo a infecção ascendente pela secreção de muco e constrição. Na mulher, a dilatação cervical durante o parto correlaciona-se com a extensão do infiltrado de neutrófilos, entretanto, os mecanismos de dilatação cervical nas cadelas não são totalmente esclarecidos (CHATDARONG et al., 2008).

A abertura ou fechamento da cérvix nas cadelas são ciclo dependente. Sob a influência estrogênica a cérvix se abre permitindo a entrada de bactérias da microbiota normal da vagina para o interior do lúmen uterino. Os produtos da secreção das glândulas, inicialmente estéreis, contêm nutrientes e pH favoráveis ao crescimento bacteriano e, com a diminuição da resposta inflamatória, a piometra pode se instalar (OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA et al., 2008). Trabalhos envolvendo investigações sobre a indução de piometra canina demonstraram que entre os dias onze e trinta, após o pico de LH, o útero torna-se mais susceptível a infecção (SMITH, 2006).

Algumas cadelas com piometra aberta podem apresentar um fechamento da cérvix durante o curso da doença, assim como cadelas com piometra fechada podem apresentar abertura cervical. Esse mecanismo de abertura e fechamento cervical pode ser devido a interações hormonais, ou pode ser apenas um fator mecânico pela pressão exercida pelo próprio acúmulo de secreção no interior do útero. De qualquer forma, o mecanismo de relaxamento cervical necessita de maiores estudos (TAMADA et al., 2012).

Durante a maior parte do ciclo estral a função da cérvix é manter a ligação do meio externo com o útero fechada, preservando a integridade uterina. Na fase folicular e no final da gestação a cérvix se abre. Para cumprir estes papéis diametrais, ocorre uma complexa e controlada mudança

estrutural, ou remodelação local. Como resultado, o firme e inflexível tecido cervical fica macio e maleável. Este processo é muitas vezes referido como amadurecimento cervical ou abertura da cérvix (HERTELENDYA e ZAKARB, 2004).

A importância da função cervical em gestações e algumas doenças levou diversos pesquisadores a estudarem a bioquímica e os mecanismos celulares da remodelação cervical. Estes estudos identificaram uma série de fatores endócrinos e parácrinos que potencialmente podem regular os processos de amadurecimento e dilatação cervical (KUNKITTI et al., 2011; FALCHI e SCARAMUZZI, 2013).

Este trabalho visa investigar os mecanismos de abertura e fechamento cervical, estudando a expressão de elementos considerados chave em um modelo tecnicamente possível para o entendimento funcional da abertura e fechamento cervical em cadelas saudáveis e com piometra.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral é estudar o mecanismo de abertura cervical em cadelas saudáveis e em cadelas com piometra aberta e fechada.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar a ocorrência, localização e concentração dos receptores de e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2 nas diferentes regiões da cérvix (luminal, glandular e muscular) de cadelas saudáveis na fase folicular e luteal do ciclo estral e em cadelas com piometra aberta e fechada.

- 2- Analisar de forma comparativa os grupos piometra aberta e piometra fechada e os grupos cadelas com piometra, cadelas saudáveis na fase folicular e luteal do ciclo estral, quanto à ocorrência, concentração e localização dos receptores de e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α e COX-2 nas diferentes regiões da cérvix.

Revisão de literatura

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. FISILOGIA DO CICLO ESTRAL

A fisiologia dos mecanismos moleculares na reprodução canina ainda permanece inexplorada. Em cães domésticos não há relação entre o período reprodutivo e a estação do ano (KEMPISTY et al., 2013). O ciclo estral dura de cinco a 12 meses e consiste de quatro fases consecutivas: anestro (com duração de 80 a 240 dias), proestro (3 a 16 dias), estro (quatro a 12 dias) e um diestro relativamente longo de 60 a 90 dias. A puberdade nas cadelas aparece entre os seis e 14 meses de idade, variando de acordo com a raça e porte do animal (CONCANNON, 2011; KEMPISTY et al., 2013).

O anestro é o período de inatividade sexual. Essa fase é encerrada por interações mal compreendidas entre o ambiente e fatores endógenos. O anestro é seguido pelo proestro, período caracterizado por edema vulvar e hemorragia, proliferação e cornificação do epitélio vaginal e secreção de feromônios. O pró-estro termina com o pico pré-ovulatório de LH. Nesta fase o comportamento da fêmea ainda é de não aceitação do macho (KEMPISTY et al., 2013).

O estro clínico dura até a cornificação máxima na citologia vaginal. No exame de vaginoscopia, a mucosa aparece enrugada e crenulada. O estro é o momento em que a cadela mostra o reflexo receptivo e aceita o macho, permitindo a cópula. A ovulação ocorre espontaneamente, normalmente no início desta fase. O ciclo fértil com estro comportamental pode aparecer desde cedo, como dois dias antes do pico de LH, até tarde, podendo chegar até seis dias após o pico (KEMPISTY et al., 2013).

O diestro dura em média 140 dias. Clinicamente o endométrio se recupera após 120 dias do final do diestro em cadelas não prenhes e cerca de 150 dias após o parto. O exame de citologia vaginal revela um pequeno número de células parabasais e neutrófilos (CONCANNON, 2011; KEMPISTY et al., 2013). Em seguida inicia-se novamente o anestro concluindo-se o ciclo estral na espécie.

Dentre os hormônios relevantes no ciclo estral das cadelas o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH), o estrógeno e a

progesterona são os mais importantes. Sob a influência do FSH, os folículos ovarianos se desenvolvem e as células foliculares produzem estrógenos, que estimulam a proliferação das células epiteliais da mucosa vaginal, aumentam a espessura da camada endometrial, promovem abertura da cérvix, aumentam o fluxo sanguíneo e a resposta inflamatória celular. As respostas ou efeitos provocados pelos estrógenos e progesterona no útero têm efeito cumulativo a cada ciclo estral (OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

Os mecanismos de regulação da reprodução canina diferem nitidamente de outras espécies. O corpo lúteo é a única fonte de progesterona em cadelas gestantes e não gestantes. Em animais não-gestantes, a regressão lútea e a diminuição do nível de progesterona ocorrem de 30 a 90 dias do diestro. A fase lútea pode ser dividida em duas partes, a primeira é independente de gonadotrofina e dura os primeiros 40 dias, e a segunda é dependente de gonadotrofinas. Além de prostaglandinas e progesterona, muitos fatores regulam a função do corpo lúteo, incluindo CD4, CD8, interleucinas e fatores tróficos (CONCANNON, 2011; KEMPISTY et al., 2013).

A piometra tem sido associada a repetidas respostas ao estrógeno durante o estro, seguida por longos intervalos de dominância da progesterona levando a modificações no endométrio (SMITH, 2006; PRETZER, 2008). A estimulação progestacional resulta em proliferação do endométrio, secreção das glândulas uterinas e diminuição das contrações do miométrio. A inibição leucocitária no útero sensibilizado pela progesterona facilita a infecção bacteriana. O endométrio, sob o estímulo da progesterona, hipertrofia-se devido a um aumento no número e no tamanho de suas glândulas, que aumentam suas atividades secretoras e um fluido estéril pode se acumular no lúmen do útero. Essas respostas aos efeitos hormonais podem ser mais exacerbadas com o uso de progestágenos exógenos (DE BOSSCHERE et al., 2001; RAGNI, 2005; PRETZ, 2008).

3.2. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ABERTURA CERVICAL

A cérvix tem um papel crucial no ciclo reprodutivo e sua consistência varia de acordo com as fases do ciclo estral. Durante o estro, a cérvix se dilata e, se fecha, durante as fases de anestro e diestro. Na cadela, alterações no

relaxamento cervical são observadas não apenas durante o ciclo estral, mas também em algumas doenças como a piometra, que pode ser classificada em piometra de cérvix aberta ou piometra de cérvix fechada de acordo com o relaxamento ou fechamento da cérvix (LINHARATTANARUKSA et al., 2014).

A cérvix executa várias funções, primeiro, ela permite a passagem dos espermatozoides e mantém uma resistência à infecção ascendente que poderia ameaçar a fertilidade. Em segundo lugar a cervix é responsável pela manutenção dos fetos durante a gestação e ainda se dilata em um tempo extremamente curto para permitir a passagem dos filhotes durante o parto (KELLY, 2002).

A mucosa cervical é constituída por um epitélio prismático simples de células produtoras de muco e uma lâmina própria onde se encontram as glândulas cervicais. A cérvix é composta principalmente de tecido conjuntivo e músculo liso, suportado por uma matriz extracelular. A matriz extracelular é uma rede composta por feixes de colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, sendo o colágeno o mais abundante e responsável por fornecer suporte estrutural ao órgão (LINHARATTANARUKSA et al., 2014).

As propriedades mecânicas da cérvix são derivadas da concentração de colágeno uma vez que o músculo liso constitui apenas 15% da massa do órgão. Feixes de colágenos proporcionam uma rigidez que pode ser alterada rapidamente por ação das colagenases. A fonte de colagenase e seu controle são temas de pesquisas e debates. Os colágenos da cérvix são principalmente dos tipos I, III e IV, tornando a cérvix uma estrutura bastante rígida (KELLY, 2002).

Na fase secretória do ciclo estral, os elevados níveis de progesterona influenciam as glândulas endometriais a produzirem um muco viscoso, que impede a passagem de microorganismos para o interior do lúmen uterino (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). A cérvix altera-se consideravelmente no final da gestação, tornando-se nas últimas semanas mais amolecida, edemaciada, elástica e como consequência torna-se mais flexível. Este processo natural é denominado amadurecimento cervical (MACEDO et al., 1998).

Um mecanismo proposto para a abertura cervical é que o relaxamento durante o estro está associado com os esteróides ovarianos e hormônios

gonadotróficos sendo causado, principalmente, por um rearranjo de fibras musculares lisas e tecido conjuntivo cervical (LEETHONGDEE et al., 2007; KERSHAW et al., 2007; FALCHI e SCARAMUZZI, 2013).

Outro mecanismo de relaxamento cervical foi proposto por FALCHI e SCARAMUZZI (2013), ou seja, os hormônios gonadotróficos e esteroides ovarianos regulam por realimentação local, a produção e secreção de fatores parácrinos, especialmente a prostaglandina. Esse modelo propõe que o FSH, LH e o estradiol atuem na cérvix regulando a expressão dos seus próprios receptores e os da ocitocina. Quando a ocitocina se liga ao seu receptor, ativa uma proteína G que desencadeia uma série de vias que conduzem ao aumento intracelular de cálcio (Ca^{2+}). O aumento intracelular Ca^{2+} é necessário para ativar a enzima fosfolipase A2 que, quando fosforilada, mobiliza ácido araquidônico (AA) a partir de fosfolípidios de membrana. O AA na sua forma livre, atua como um substrato para ciclooxigenase-2 (COX-2), que catalisa a conversão em prostaglandina H2. A prostaglandina H2, por sua vez, é o substrato para a ação de sintetases de prostaglandinas específicas que convertem prostaglandina H2 em um produto final.

Sugere-se que as prostaglandinas causem o relaxamento do músculo liso, o amolecimento e da dispersão da matriz extracelular da cérvix, resultando em dilatação cervical (FALCHI e SCARAMUZZI, 2013).

Linharattanaruksa et al. (2013) sugeriram que o aumento da expressão de prostaglandinas é estimulada por citocinas pró-inflamatórias, resultando no aumento da produção de PGE2 que, posteriormente, estimula a infiltração de neutrófilos através de IL-8 e liberta a metaloproteinases que possivelmente sejam responsáveis por degradar a matriz extracelular provocando o relaxamento cervical.

3.2.1 DOSAGEM SÉRICA DE ESTRÓGENOS E PROGESTERONA E RECEPTORES DE ESTRÓGENOS E PROGESTERONA.

Ainda é desconhecido o processo de desenvolvimento de piometra aberta ou fechada. Algumas hipóteses já foram levantadas, sendo a de Weiss et al. (2004) bastante expressiva. Ao analisar a concentração hormonal de cadelas com diagnóstico de piometra, o estradiol não apresentou diferença

significativa: piometra aberta, $43 \pm 6,5$ pg/mL; fechada, $56,3 \pm 11,9$ pg/mL. Quanto à análise da progesterona, os resultados apresentaram diferenças significativas sendo de $4,8 \pm 0,9$ ng/mL para a piometra aberta e de $13,2 \pm 5,5$ ng/mL para a piometra fechada.

No estudo realizado por Volpato (2011) não foi observada diferença significativa entre as concentrações de progesterona quando os grupos piometra aberta (25 animais) e fechada (06 animais) foram comparados.

Segundo Kunkitti et al. (2011), os receptores de estrógeno e progesterona controlam a abertura e fechamento cervical durante o ciclo estral, porém, o mecanismo envolvido, as mudanças e associações bioquímicas que ocorrem nesse processo não foram totalmente esclarecidas.

Volpato et al. (2012), utilizando a técnica de imunistoquímica, pesquisaram receptores de estrógeno α e β no útero e cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada. Nesse estudo foi realizada a identificação e quantificação desses receptores nas regiões glandular e estromal do útero e nas regiões epitelial, glandular e estromal da cérvix. Não foi verificada diferença estatística entre os grupos piometra aberta e piometra fechada relacionados a expressão dos receptores α e β e nos locais avaliados. Na cérvix o epitélio glandular foi corado mais intensamente quando comparado com o estroma e o epitélio luminal. Levando em consideração que a concentração de receptores é diretamente proporcional a intensidade da marcação, a região com o maior número de RE α foi o epitélio glandular do útero e cérvix.

O número de núcleos positivos para receptores de estrógeno e progesterona não diferiram entre as cadelas com piometra aberta e piometra fechada (KUNKITTI et al., 2011; VOLPATO et al., 2012), entretanto, Volpato et al. (2012) identificaram diferenças na marcação dos receptores de progesterona. Houve uma maior concentração de receptores de progesterona na cérvix de cadelas com piometra fechada e a reatividade foi mais intensa no estroma quando comparada com o epitélio glandular e luminal, existindo, portanto, um maior número de receptores de progesterona no estroma quando comparado as outras regiões da cérvix.

3.2.2. COLÁGENOS I E III

Durante a dilatação cervical, as longas fibras de colágenos são substituídos por agregados de fibras mais curtas e mais finas. Ocorre assim uma alteração da orientação do colágeno e o colo do útero pode dilatar-se. Isto sugere que a orientação das fibras são importantes na manutenção da rigidez cervical e desempenham um papel importante na processo de amadurecimento cervical durante a gestação (YU et al., 1995; MARX et al., 2006).

O relaxamento da cérvix também está associado com um influxo de leucócitos, incluindo os neutrófilos, que têm um elevado potencial para a liberação de collagenase. O colágeno proporciona a rigidez da cérvix e há uma probabilidade de que granulócitos estejam envolvidos no processo de amadurecimento fisiológico normal da cérvix. Os neutrófilos são importantes fontes de collagenases específicas que estão contidas dentro do subconjunto de grânulos do citoplasma. O óxido nítrico, outra substância vasoativa, também está envolvido nos efeitos diretos sobre os neutrófilos, mas seus mecanismos ainda não estão esclarecidos (KELLY, 2002).

A invasão de células inflamatórias tem sido sugerida como uma possível causa de degradação de colágenos e relaxamento cervical. Em mulheres, o grau de dilatação cervical está diretamente relacionado com a extensão do infiltrado neutrofílico que pode, posteriormente, produzir enzimas collagenolíticas como proteases e metaloproteinases. O aumento dessas enzimas pode degradar o colágeno recém-sintetizado e assim, diminuir a proporção colágeno/musculatura lisa na cérvix interferindo no grau de relaxamento cervical em cadelas com doenças uterinas (KUNKITTI et al., 2011).

O relaxamento da cérvix é regulado pela musculatura lisa, tecido fibroso e elastina. A remodelação da matriz extracelular tem um papel importante na dilatação cervical pela degradação do colágeno. Em trabalho realizado por Chatdarong et al. (2010), foi postulado que o útero de cadelas cíclicas tem menor proporção de colágeno comparado com musculatura lisa. Isso gera uma diminuição da resistência à tração, causando o relaxamento da cérvix. Resultado semelhante é observado nas cadelas com piometra de cérvix aberta,

sugerindo que a abertura da cérvix é associada a uma diminuição da proporção de colágenos frente a fibras musculares.

Dezenove tipos de colágenos já foram identificados. Na cérvix os colágenos I e III são encontrados em maior número. Na cérvix aberta não se observam fibras elásticas no endométrio e as fibras de colágeno se encontram numa densidade menor quando comparadas a cérvix fechada, onde as fibras de colágeno se encontram mais densas e ordenadas. A medida que a dilatação cervical aumenta, as fibras de colágeno se tornam mais finas e os espaços entre as fibras se tornam maiores (TAMADA et al., 2012).

Segundo Linharattanaruksa et al. (2014) o afrouxamento do colágeno na cérvix é caracterizado pela diminuição nas interações dos glicosaminoglicanos, provavelmente induzida por enzimas colagenolítica, tais como as metaloproteinases da matriz cervical embora o exato mecanismo que altera a permeabilidade da cérvix em cadelas com piometra ainda não está claro. A proporção de colágeno/músculo liso é alterada dependendo das fases do ciclo estral, sendo a proporção maior na fase luteal quando comparada a fase folicular, sugerindo que essas modificações estejam relacionadas com os hormônios ovarianos.

Volpato et al. (2012) identificaram receptores para colágeno I e III nas regiões glandular e muscular, tanto do útero quanto da cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada. Os resultados não identificaram diferenças significativas entre as duas condições avaliadas e nem entre as regiões investigadas. Um aumento nas concentrações de colágeno também não foi identificado em casos de piometra fechada no estudo de Tamada et al. (2012).

3.2.3. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (ON) é uma molécula não polar que livremente difunde-se através das membranas. Uma das características químicas mais originais e importante do ON é ser uma espécie paramagnética (STAMLER et al., 1992; DIXIT e PARVIZI et al., 2001)

O ON é responsável por muitas funções nos mamíferos e parece ser um importante regulador parácrino de vários processos reprodutivos femininos, como a secreção de gonadotrofinas, ovulação, regressão do corpo lúteo,

implantação e desenvolvimento embrionário, contratilidade uterina, amadurecimento cervical e o parto (MOTTA et al., 2001; DIXIT e PARVIZI, 2001; LAPOINTE et al., 2006).

O óxido nítrico é um potente vasodilatador e um mediador da permeabilidade vascular. Além disso, o óxido nítrico aumenta a expressão de algumas metaloproteinases específicas que são conhecidas por participar da remodelação de tecidos (NOVARO et al., 2001; SORDELLI, et al., 2012).

Estudos têm incidido sobre o óxido nítrico sintetase (NOS) / óxido nítrico (ON). O sistema NOS/NO tem sido postulado como tendo um papel regulador no miométrio e colo do útero durante a gestação e o parto. A atividade NOS leva a produção de ON e é a via final na indução de mudanças químicas associadas com a maturação cervical. No colo do útero humano, o amadurecimento está associado com um aumento do NOS. O aumento de ON na cérvix leva ao aumento na atividade de metaloproteinase, apoptose celular e síntese de glicosaminoglicano. Todas estas modificações estão associadas com o processo de amadurecimento cervical (ROSSELLI et al., 1998; DIXIT e PARVIZI, 2001; POULOS e LI, 2013).

A presença e migração de células inflamatórias podem causar o aumento das atividades do óxido nítrico sintetase, juntamente com outros agentes inflamatórios como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa e interleucina-8 (IL-8). Esses mecanismos parecem estar envolvidos no amadurecimento cervical devido ao processo de remodelação do tecido inflamatório e quebra de pontes químicas entre as fibras de colágeno (GOLDBERG, 2014).

Diversos agentes podem ser utilizados na tentativa de relaxar a cérvix. Farmacologicamente são quimiocinas como a interleucina, análogos da prostaglandinas e ON. A NOS é encontrada na cérvix de ratos, cobaias e suínos e tem sua concentração elevada durante o parto. As mudanças observadas na cérvix de suínos após administração de nitroprussiato de sódio assemelham-se àquelas após maturação fisiológica normal ao parto, com influxo de monócitos e granulócitos (KELLY, 2002).

As i-NOS são a forma induzível e foram localizados na porção muscular, no músculo liso vascular e no epitélio da cérvix, estando presente também no colo do útero de diversas espécies durante a gestação e durante o parto,

sugerindo que o ON tenha um papel importante no processo de amadurecimento cervical e parto. Aplicações locais de ON em animais e seres humanos produzem características associadas ao processo de amadurecimento cervical (LEDINGHAM et al., 2000). Sob condições anormais, a progesterona prolonga a gestação e parece causar um aumento da expressão de i-NOS, o que sugere seu envolvimento na cascata de amadurecimento cervical (MARX et al., 2006).

3.2.4. FAS/FAS-L

O sistema FAS/FAS-L é o responsável por regular a apoptose, existindo diversos mecanismos de forma fisiológica e outros patológicos. O receptor FAS é responsável pela morte celular a partir do fator de necrose tumoral e seu ligante, FAS-L, induz trimerização e recrutamento de domínio de morte (LERMA et al., 2008).

A regulação da apoptose envolve um conjunto complexo de eventos por meio de interação de vários genes com efeitos estimulantes e inibitórios na morte celular programada. FAS (também chamado CD95 ou APO-1) é uma proteína de membrana do tipo I, membro do subgrupo da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral que contêm um domínio de morte intracelular, pode iniciar a sinalização da apoptose e tem um papel crítico na regulação do sistema imunológico. Foi originalmente descoberto como sendo a via final de anticorpos que provocam a morte celular por apoptose (KAYISLI et al., 2003; KAUFMANN et al., 2012; HANSFORD et al., 2013).

Apoptose induzida por FAS requer recrutamento e ativação da caspase iniciadora, caspase-8 (em humanos também caspase-10), dentro do complexo de sinalização de indução a morte. Além de apoptose, FAS pode desencadear várias vias de sinalização não apoptóticas, assim como vias que promovem a ativação das células e proliferação celular (KAUFMANN et al., 2012).

A função de FAS-L é regulada por deposição na membrana plasmática e mediada por metaloproteases, podendo ter atividades não apoptóticas, tais como a indução de resposta inflamatória (TRAMBAS e GRIFFITHS, 2003; WILSON et al., 2009).

3.2.5. PROSTAGLANDINAS

As prostaglandinas (PGs) representam uma família de mediadores lipídicos, que também compreendem os leucotrienos e tromboxanos e consistem de quatro membros, nomeados D2 prostaglandina (PGD2), prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina F2 α (PGF2 α) e prostaciclina. As PGs estão profundamente envolvidas nas funções reprodutivas tais como ovulação, fertilização, implantação e parto. Elas também desempenham papéis cruciais nas doenças endometriais e na manutenção da gestação (SALES e JABBOUR, 2003; ACHACHE e REVEL, 2006; CARLI et al., 2009; ST-LOUIS et al., 2010).

Aplicações de PGs em animais e humanos produzem características locais associadas ao amadurecimento cervical. Esse processo sugere que as PGs desempenham um papel importante no amadurecimento do colo do útero e no parto (MARX et al., 2006). As propriedades luteolíticas e uterotônicas da PGF2 α têm sido utilizadas para tratar a piometra, principalmente a forma aberta, em cadelas jovens e com funções renais e hepáticas normais. O uso de prostaglandina em casos de piometra fechada está associado ao risco de peritonite, por ocorrer a passagem forçada de fluido contaminado do útero para as bursas dos ovários e, assim, para dentro da cavidade peritoneal, ou ruptura da parede uterina. A eficácia de PGF2 α é principalmente devido à sua capacidade de induzir a contração uterina (FIENI et al., 2014).

Sabe-se que o endométrio canino sintetiza e libera prostaglandinas (ENGINLER et al., 2014). O aumento de metabólitos foi observado durante situações fisiológicas como o parto e o período pós-parto em cadelas, mas também em situações patológicas como nos casos de piometra (HAGMAN et al., 2006a; HAGMAN et al., 2006b). O aumento das concentrações dos metabólitos de PGF2 α provavelmente provém da síntese endometrial de prostaglandinas, as quais, na piometra canina, são o resultado da estimulação uterina pelas endotoxinas. Esse aumento da síntese endometrial de PGE2 e PGF2 α pode regular a resposta inflamatória local (SILVA et al., 2009).

No estro, o grau de relaxamento do colo do útero é provavelmente regulado pela síntese de prostaglandinas e remodelação da matriz extracelular.

A prostaglandina atua estimulando o relaxamento do músculo liso e a síntese de glicosaminoglicanos. A síntese de ácido hialurônico pode causar a remodelação da matriz extracelular do colo do útero culminando com o relaxamento cervical (KERSHAW et al., 2009).

Desde o final da década de 1970, aplicação local na vagina ou colo uterino em mulheres e a administração sistêmica de PGs e análogos sintéticos têm sido consistentemente capaz de induzir o amadurecimento do colo (HERTELENDYA e ZAKARB, 2004). A eficiência clínica é um forte indício de que as PGs podem ter um papel na fisiologia da remodelação da cérvix.

Uma quantidade substancial de dados clínicos e evidências experimentais e laboratoriais sugerem que as PGs são mediadores da remodelação cervical antes e durante o parto. As prostaglandinas são capazes de desencadear a remodelação cervical de uma maneira que se assemelha as alterações do parto espontâneo, mas suas funções específicas ainda não foram definidas (HERTELENDYA e ZAKARB, 2004).

A PGF₂ α está envolvida no processo de abertura cervical através da sua capacidade de estimular o aumento dos glicosaminoglicanos. O amadurecimento cervical é associado com o aumento na atividade dos metaloproteinases, enzimas que degradam proteínas da matriz extracelular, e assim, aumentam a degradação de colágeno recém-sintetizado, o que leva a diminuição do colágeno no local, relaxando a cérvix (ST-LOUIS et al., 2010; ENGINLER et al., 2014; FIENI et al., 2014).

A deposição de PGE₂ na vagina ou cérvix da mulher, ovelha, égua e vaca origina um relaxamento e dilatação cervical *in vivo*, independentemente do estado fisiológico e das concentrações de progesterona. Na mulher, a aplicação de prostaglandinas na cérvix antes do parto induz a dilatação cervical (NUNES et al., 1999; BARBAS et al., 2001).

Algumas prostaglandinas diminuem a atividade contrátil da musculatura cervical, sendo a PGE₂ aquela que apresenta uma atividade inibidora mais potente mesmo em doses baixas. O misoprostol, um análogo sintético da PGE₁, tem se mostrado altamente eficiente na indução da abertura cervical e no estímulo da atividade contrátil do miométrio (NUNES et al., 1999; BARBAS et al., 2001; KELLY, 2002).

É sabido que as prostaglandinas estão envolvidas no amadurecimento cervical fisiológico, sendo os fibroblastos cervicais iniciadores do processo controlando a permeabilidade e dilatação dos pequenos vasos sanguíneos. As prostaglandinas podem também apresentar um efeito direto na estimulação da matriz metaloproteinase. O efeito vasoativo da PGE2 facilita a penetração de leucócitos na cérvix e os neutrófilos abundantes na circulação periférica são uma fonte importante de colagenase para o amadurecimento cervical final (KELLY, 2002).

A infecção da cérvix e útero podem levar a um enfraquecimento da cérvix podendo ser um fator contribuinte nos casos de trabalho de parto prematuro. A atividade da *prostaglandina desidrogenase* é reduzida na presença de infecções permitindo, portanto, a atuação da prostaglandina no local (KELLY, 2002; WESS et al., 2004).

3.2.6. CICLO-OXIGENASE

A ciclo-oxigenase (COX) é uma enzima chave na síntese de prostanóides, sendo um potente mensageiro de lipídios bioativos com várias funções importantes. Foi descoberta na década de 1990 e existe em duas isoformas, COX-1 e COX-2. A COX-1 é referida como um 'isoforma constitutiva', sendo expressa na maioria dos tecidos em condições basais. Em contraste, COX-2 é conhecida como um 'isoforma induzível', indetectável na maioria dos tecidos normais, mas sua expressão aumenta durante várias condições patológicas (SIMMONS et al., 2004; ZIDAR et al., 2009).

A COX- 2 é localizada na porção muscular, no músculo liso vascular e no epitélio da cérvix e aumentam acentuadamente antes ou durante o trabalho de parto. A indometacina, um inibidor inespecífico da COX, evita abortamentos espontâneos ou trabalho de parto prematuro em mulheres, pois inibe o relaxamento cervical (BUKOWSKI et al., 2001; MARX et al., 2006) mostrando assim o envolvimento da COX no mecanismo de abertura e fechamento cervical.

A regulação hormonal da COX-2 tem sido amplamente investigada e, potencialmente, as gonadotrofinas (FSH e LH) e hormônios esteróides reprodutivos (progesterona e estradiol) podem aumentar a expressão de COX-

2 no útero e cérvix. Uma possível explicação para este controle multifatorial, é que a regulação de COX-2 é focada na síntese de PGF2 α . No momento em que os altos níveis de progesterona regulam o receptor, ele conduz a um aumento da COX-2 (RUPNOW et al., 2002; ZHANG et al., 2007; FALCHI e SCARAMUZZI, 2013).

O mecanismo de dilatação da cérvix inclui uma série de interações que ocorrem através de reações químicas estimuladas por diferentes hormônios. A enzima COX-2 está envolvida com o aumento local de PGE2. Esse aumento conduz a diversas alterações associadas ao amadurecimento cervical, como a dilatação dos pequenos vasos, aumento da degradação do colágeno, aumento do ácido hialurônico, aumento da quimiotaxia dos leucócitos e aumento do estímulo e liberação da interleucina-8 (IL-8) (MARX et al., 2006; GOLDBERG, 2014).

O relaxamento cervical é provavelmente mediado por mudanças nos hormônios periovulatórios, síntese de prostaglandinas e remodelação da matriz extracelular do colo do útero. Há um aumento na expressão de COX-2 na cérvix de ovelhas no cio que está associada com a remodelação do colágeno (KERSHAW et al., 2007), sugerindo que o aumento da expressão de COX-2 pode aumentar a síntese de prostaglandina E2, que age sobre a matriz extracelular do colo do útero para induzir o relaxamento cervical. O mecanismo pelo qual a PGE2 pode regular as alterações da matriz extracelular cervical das ovelhas não é totalmente compreendido (KERSHAW et al., 2009).

Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa em questão atendeu aos requisitos impostos pela Comissão de Ética no Uso de Animais de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus Botucatu, recebendo o protocolo número 217/2011– CEEA.

Foram utilizadas 34 cadelas, sendo 22 com diagnóstico de piometra e 12 consideradas saudáveis utilizadas como controle. Das 12 cadelas consideradas normais, seis encontravam-se na fase luteal do ciclo estral e seis na fase folicular. Todas as fêmeas foram selecionadas entre aquelas atendidas na área de Reprodução de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

O diagnóstico de piometra foi realizado por meio do histórico clínico, exames físico e complementares como hemograma e avaliação ultrassonográfica. As cadelas em fase luteal e fase folicular foram assim classificadas baseado na história reprodutiva, dos sinais clínicos e da inspeção macroscópica dos ovários e do útero durante a ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva, sendo confirmadas as fases através da dosagem sérica de progesterona.

Destas 34 fêmeas foram coletadas amostras de sangue para dosagem sérica de progesterona. Após o procedimento da OSH foram coletados fragmentos da cérvix para a avaliação imunohistoquímica dos receptores de e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2.

Do total de cadelas com piometra, 11(50%), apresentavam secreção vaginal purulenta, mucopurulenta ou sanguinolenta e 11(50%), foram diagnosticadas como piometra de cérvix de fechada.

4.1. DOSAGEM SÉRICA DE PROGESTERONA

O sangue foi coletado por venopunção de veia jugular em frascos sem anticoagulante e foi levado imediatamente ao Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres onde foi centrifugado (Centrífuga LS-3 – Celm[®]

- 1700x g) por 10 minutos para obtenção do soro, que foi identificado com o nome e número de registro dos animais e armazenado a temperatura de -18°C até o momento da avaliação hormonal.

Após descongelação em temperatura ambiente, todas as amostras de soro foram avaliadas quanto às suas concentrações de progesterona. As dosagens foram realizadas utilizando-se kits comerciais em fase sólida (Coat A – Count Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, Califórnia, USA), com leitura por sistema de radioimunoensaio (Packard Cobra II Auto Gamma- GMI Inc. – Minnesota - USA) seguindo-se as instruções do fabricante. As dosagens de progesterona foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu.

4.2. ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Os fragmentos cervicais foram coletados após a realização da OSH. Foi realizado dois cortes longitudinais na porção média da cérvix, coletando um fragmento com todas as camadas cervicais, esses foram fixados em formol tamponado 10% durante 24 horas e, posteriormente, mantidos em álcool 70% até o momento de inclusão em parafina, realizada no Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu. Após a inclusão, cortes de três µm foram obtidos, montados em lâminas com extremidade fosca e corados inicialmente em HE para avaliar a qualidade do material. Posteriormente novos cortes de três µm foram realizados e colocados em lâminas com extremidade fosca, previamente tratadas com Poly-L-lysina (Poly-L-lysine[®] – Sigma Chemical Co.- USA).

Para a desparafinização do material emblocado, as lâminas foram mantidas em estufa a 55°C por 24 horas e, posteriormente, colocadas em cuba de vidro com xilol à temperatura ambiente por 30 minutos e, a seguir mantidas em uma nova solução de xilol por 20 minutos. As lâminas foram transferidas para cubas de vidro para a hidratação em banhos de álcool, permanecendo por três minutos em cada cuba (álcool absoluto I, II, III, álcool 95% e 85%). Posteriormente as lâminas foram submetidas a dez passagens de água

destilada. A partir desta etapa o tratamento se difere para cada antígeno pesquisado:

✓ Receptores e-NOS: para a detecção de receptores de e-NOS realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em microondas, potência máxima - 750W, durante 10 minutos (2 ciclos de cinco minutos cada). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas com protein block (Dako, SERUM FREE Ready TO-USE, USA) por 30 minutos em estufa a 27°C, o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:100 (anticorpo rabbit polyclonal antibody to eNOS, abcam[®] - USA. Cód ab5589. Lot. GR102591-1), em câmara úmida durante 2h à temperatura de 37°C.

✓ Receptores i-NOS: para a detecção de receptores de i-NOS realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em microondas, potência máxima - 750W, durante 10 minutos (2 ciclos de cinco minutos cada). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas com protein block (Dako, SERUM FREE Ready TO-USE, USA) por 30 minutos em estufa a 27°C, o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:100 (anticorpo rabbit polyclonal antibody to iNOS, abcam[®] - USA. Cód ab3523. Lot. GR104194-1), em câmara úmida durante 2h à temperatura de 37°C.

✓ Receptores FAS: para a detecção de receptores FAS realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em microondas, potência máxima - 750W, durante 10 minutos (2 ciclos de cinco minutos cada). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas com protein block (Dako, SERUM FREE Ready TO-USE, USA) por 30 minutos em estufa a 27°C, o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:500 (anticorpo rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology[®] - USA. Cód sc715. Lot. J2912), em câmara úmida durante 2h à temperatura de 37°C.

✓ Receptores FAS-L: para a detecção de receptores FAS-L realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako-USA). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas com protein block (Dako, SERUM FREE Ready TO-USE, USA) por 30 minutos em estufa a 27°C, o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:500 (anticorpo rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology[®] - USA. Cód sc956. Lot. E1311), em câmara úmida durante 2h à temperatura de 37°C.

✓ Receptores PGF2 α -R: para a detecção de receptores PGF2 α -R realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em panela de pressão tipo pascal

(Dako-USA). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas com protein block (Dako, SERUM FREE Ready TO-USE, USA) por 30 minutos em estufa a 27°C, o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:200 (anticorpo rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology[®] - USA. Cód sc67029. Lot. D0108), em câmara úmida durante 2h à temperatura de 37°C.

✓ Receptores COX-2: para a detecção de receptores COX-2 realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako-USA). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas com protein block (Dako, SERUM FREE Ready TO-USE, USA) por 30 minutos em estufa a 27°C, o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:100 (anticorpo monoclonal mouse, anti Human, Dako[®] - USA. Clone CX-294. Ref:M3917 Lot. 10052367), em câmara úmida durante 2h à temperatura de 37°C.

As próximas etapas foram semelhantes para todos os antígenos.

Após as 2 horas de incubação com o anticorpo primário em câmara úmida a 37°C, o material foi então submetido a banhos de TRIS e, posteriormente, incubado com o anticorpo secundário Histofine[®] (Nichirei Biosciences Inc. - Japan) por 30 minutos, ainda em câmara úmida, segundo instruções do fabricante. Realizou-se 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 ao abrigo da luz e novamente lavagem com solução tampão TRIS - pH 7,4.

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, e a coloração interrompida com lavagem em água corrente por 10 minutos e cinco passagens em água destilada.

Procedeu-se, então, a desidratação do material com banhos de álcool. As lâminas permaneceram 3 minutos em cada cuba (álcool 85%, 95%, álcool absoluto I, II, III, xilol I e II) e foram montadas com lamínulas utilizando-se resina sintética - Permount (Fisher Scientific – cód. UN1294e).

Como controle negativo, em outro corte de cérvix foi empregado a substituição do anticorpo primário pela imunoglobulina da mesma espécie onde foi produzida o primário, ou seja, foi empregado imunoglobulina de camundongo quando se tratava de anticorpos monoclonais (N-Universal Negative Control Mouse – DakoCytomation – CA, USA. Cód N1698) e frações de imunoglobulinas séricas de coelho para o anticorpo policlonal (N-Universal Negative Control Rabbit – DakoCytomation – CA, USA. Cód N1699).

Depois de todas as lâminas confeccionadas e identificadas realizou-se a leitura. As regiões avaliadas na cérvix foram o epitélio luminal, região glandular e o muscular. Para todos os receptores a marcação foi citoplasmática.

Para avaliar a imunomarcação foram utilizados dois métodos, realizamos pelo mesmo operador, no mesmo momento. No primeiro, em cada um desses tecidos foram avaliados cinco campos, cada campo recebeu um escore de 0 a 4 (sendo 0 = 0 a 5% do campo positivo, 1 = 5 a 25% do campo positivo, 2 = 25 a 50%, 3 = 50 a 75% do campo positivo e 4 = 75 a 100% do campo positivo) sendo considerados positivos aqueles citoplasmas corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. No segundo método, a intensidade das marcações foi avaliada de forma subjetiva em nenhuma, fraca, moderada e forte, recebendo respectivamente escore 0, 1, 2 e 3 para a análise estatística. As leituras foram realizadas em cinco campos aleatórios, sendo todos os campos homogêneos (mais de 80% da coloração com a mesma intensidade). As avaliações foram realizadas em um microscópio de luz no aumento 400 vezes.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software utilizado para a realização da estatística foi o SPSS Statistics 17.0. Para comparação dos grupos piometra de cérvix aberta e piometra de cérvix fechada calcularam-se os valores medianos das medidas de cada indivíduo nos cinco campos avaliados para todos os receptores, nas três regiões consideradas em cada grupo (unidade amostral).

Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparar a presença e a concentração de cada receptor e região entre os grupos piometra fechada e aberta. Este teste é utilizado para variáveis categóricas e para grupos independentes. Os valores de p menores que 0,05 indicam uma diferença significativa da medida mediana entre os grupos.

Entre os grupos piometra, fase luteal e fase folicular, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis, pois a comparação foi realizada entre 3 grupos independentes. Este teste não é paramétrico e também é indicado para variáveis categóricas. O valor de p menor que 0,05 indica que pelo menos um dos grupos apresenta mediana diferente dos demais. Para os casos significativos realizaram-se as comparações múltiplas para identificação do grupo que apresenta mediana diferente dos demais.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. DOSAGEM SÉRICA DE PROGESTERONA

Dos 34 animais estudados, 22 apresentavam quadro clínico e exames complementares compatível com diagnóstico de piometra (11 com piometra aberta e 11 com piometra fechada). Das 12 cadelas utilizadas como controle, seis foram classificadas na fase folicular do ciclo estral e seis na fase luteal de acordo com a avaliação macroscópica dos ovários após a OSH, sendo observadas estruturas típicas de cada fase, folículos e corpos lúteos, respectivamente. As fases do ciclo estral foram confirmadas através da dosagem sérica de progesterona (Tabela 01).

TABELA 01: Valores das dosagens séricas de progesterona (ng/mL) dos animais dos grupos piometra aberta (PA), piometra fechada (PF), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

GRUPOS			
<i>Piometra aberta</i>	<i>Piometra fechada</i>	<i>Fase folicular</i>	<i>Fase luteal</i>
0,946	9,290	1,374	7,191
10,276	9,329	5,730	8,958
18,593	9,671	1,516	9,858
3,568	18,902	1,925	7,342
2,435	7,467	0,932	8,107
0,658	7,894	3,490	20,479
0,286	7,235		
2,366	1,809		
2,758	1,613		
2,858	0,512		
11,990	Out*		
Média =5,1580	Média =7,3722	Média =2,4945	Média =10,3225

- valor menor que 0,1

5.2. IMUNOISTOQUÍMICA

5.2.1. Receptores e-NOS

Foram avaliadas imunomarcações de receptores de e-NOS na cérvix (Figura 1) de cadelas com piometra e em fases folicular e luteal do ciclo estral. Os resultados estão demonstrados nas tabelas 02 a 09.

TABELA 02: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de e-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor MW
e-NOS_total	PA	2	3	4	0,556
	PF	3	3	4	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 03: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de e-NOS no epitélio luminal (e-NOS_luminal), região glandular (e-NOS_glandular) e região muscular (e-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor M-W
e-NOS_luminal	PA	0	1	3	0,701
	PF	0	1	4	
e-NOS_glandular	PA	3	4	4	0,402
	PF	4	4	4	
e-NOS_muscular	PA	2	3	4	0,219
	PF	3	4	4	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 04: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de e-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor MW
e-NOS_total	PA	1	1	1	0,261
	PF	1	1	2	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 05: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de e-NOS no epitelo luminal (e-NOS_luminal), região glandular (e-NOS_glandular) e região muscular (e-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis					
	Região tecidual	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor M-W
e-NOS_luminal	PA		0	1	1	0,851
	PF		0	1	1	
e-NOS_glandular	PA		1	1	1	0,049
	PF		1	1	2	
e-NOS_muscular	PA		2	2	3	0,421
	PF		1	2	3	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

Após análise estatística foi constatada diferença significativa na imunomarco dos receptores e-NOS, sendo a maior concentrao (intensidade) observada na região glandular do grupo piometra fechada em relao ao grupo piometra aberta.

TABELA 06: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de e-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>		Percentis			
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
e-NOS_total	PI	2	3	4	0,069
	FF	4	4	4	
	FL	4	4	4	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 07: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de e-NOS no epitélio luminal (e-NOS_luminal), região glandular (e-NOS_glandular) e região muscular (e-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>		Percentis			
Região tecidual	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
e-NOS_luminal	PI	0	1	4	0,390
	FF	1	4	4	
	FL	0	3	4	
e-NOS_glandular	PI	3	4	4	0,148
	FF	4	4	4	
	FL	4	4	4	
e-NOS_muscular	PI	2	3	4	0,518
	FF	3	4	4	
	FL	3	4	4	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 08: Valores medianos a intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de e-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
e-NOS_total	PI	1	1	1	0,028
	FF	1	2	2	
	FL	1	2	2	

Teste Kruskall-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 09: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de e-NOS no eptlio luminal (e-NOS_luminal), região glandular (e-NOS_glandular) e região muscular (e-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
e-NOS_luminal	PI	0	1	1	0,592
	FF	1	1	2	
	FL	0	1	1	
e-NOS_glandular	PI	1	1	2	0,148
	FF	1	2	2	
	FL	1	2	2	
e-NOS_muscular	PI	1	2	3	0,296
	FF	1	2	2	
	FL	2	3	3	

Teste Kruskall-Wallis – considerando p-valor < 0,05

Foi constatada diferença significativa na imunomarco dos receptores e-NOS, sendo a menor concentrao (intensidade) evidenciada no grupo piometra em relao aos grupos fase folicular e fase luteal.

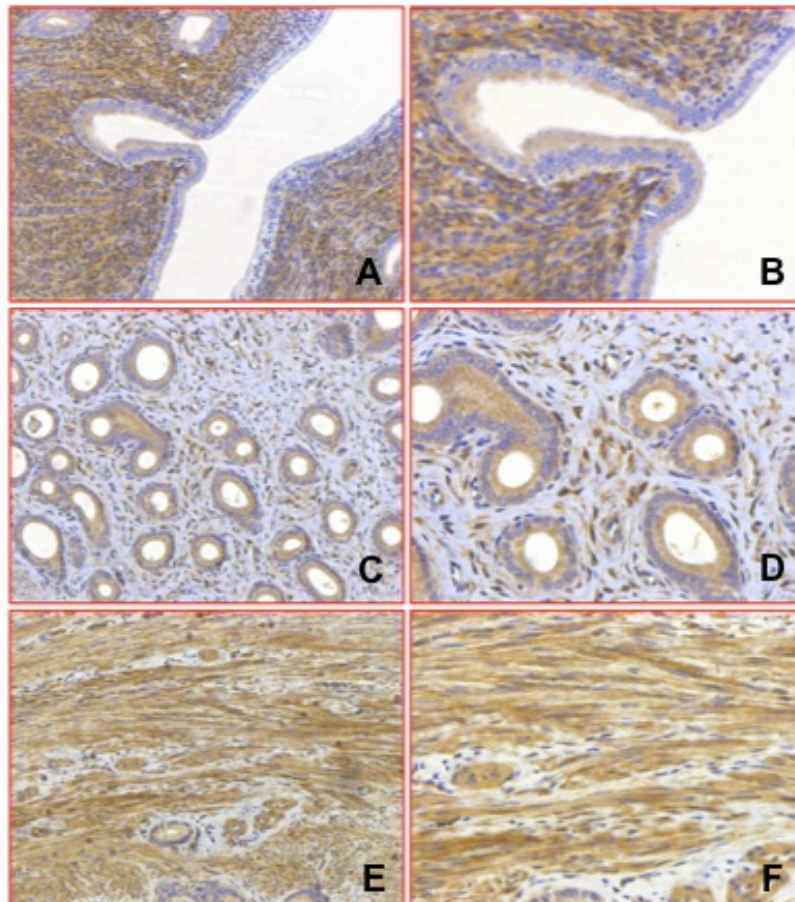


Figura 01: Detecção imunoistoquímica de receptores e-NOS, sendo considerados citoplasmas positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. “A” receptores de e-NOS no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de e-NOS no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de e-NOS na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de e-NOS na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de e-NOS na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de e-NOS na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

5.2.2. Receptores i-NOS

Foram avaliadas imunomarcações dos receptores de i-NOS na cérvix (Figura 2) de cadelas com piometra e em fases folicular e luteal do ciclo estral. Os resultados estão demonstrados nas tabelas 10 a 17.

TABELA 10: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de i-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>		Percentis			
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor MW
i-NOS_total	PA	4	4	4	0,687
	PF	3	4	4	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 11: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de i-NOS no epitélio luminal (i-NOS_luminal), região glandular (i-NOS_glandular) e região muscular (i-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>		Percentis			
Região tecidual	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor M-W
i-NOS_luminal	PA	4	4	4	0,654
	PF	1	4	4	
i-NOS_glandular	PA	4	4	4	0,582
	PF	4	4	4	
i-NOS_muscular	PA	2	3	4	0,451
	PF	2	3	4	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 12: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de i-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1ºQuartil	Mediana	3ºQuartil	p-valor MW
i-NOS_total	PA	1	2	3	0,557
	PF	1	2	2	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 13: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de i-NOS no epitélio luminal (i-NOS_luminal), região glandular (i-NOS_glandular) e região muscular (i-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis					
	Região tecidual	Grupo	1ºQuartil	Mediana	3ºQuartil	p-valor M-W
i-NOS_luminal	PA		1	1	3	0,604
	PF		1	2	2	
i-NOS_glandular	PA		1	2	3	1,000
	PF		1	2	3	
i-NOS_muscular	PA		1	3	3	0,141
	PF		1	1	2	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

Não foi constatada diferença significativa na imunomarcção dos receptores i-NOS entre os grupos piometra aberta e piometra fechada.

TABELA 14: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de i-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>		Percentis			
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
i-NOS_total	PI	4	4	4	0,460
	FF	4	4	4	
	FL	3	4	4	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 15: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de i-NOS no epitélio luminal (i-NOS_luminal), região glandular (i-NOS_glandular) e região muscular (i-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>		Percentis			
Região tecidual	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
i-NOS_luminal	PI	3	4	4	0,217
	FF	1	2	4	
	FL	0	4	4	
i-NOS_glandular	PI	4	4	4	0,607
	FF	4	4	4	
	FL	3	4	4	
i-NOS_muscular	PI	2	3	4	0,191
	FF	3	4	4	
	FL	3	4	4	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 16: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de i-NOS na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1ºQuartil	Mediana	3ºQuartil	p-valor K-W
i-NOS_total	PI	1	2	3	0,139
	FF	1	1	2	
	FL	2	3	3	

Teste Kruskall-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 17: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de i-NOS no epitélio luminal (i-NOS_luminal), região glandular (i-NOS_glandular) e região muscular (i-NOS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1ºQuartil	Mediana	3ºQuartil	p-valor K-W
i-NOS_luminal	PI	1	2	3	0,377
	FF	1	1	2	
	FL	1	3	3	
i-NOS_glandular	PI	1	2	3	0,307
	FF	1	2	3	
	FL	2	3	3	
i-NOS_muscular	PI	1	2	3	0,066
	FF	1	1	1	
	FL	2	3	3	

Teste Kruskall-Wallis – considerando p-valor < 0,05

Não foi constatada diferença significativa na imunomarco dos receptores i-NOS entre os grupos piometra, fase folicular e fase luteal.

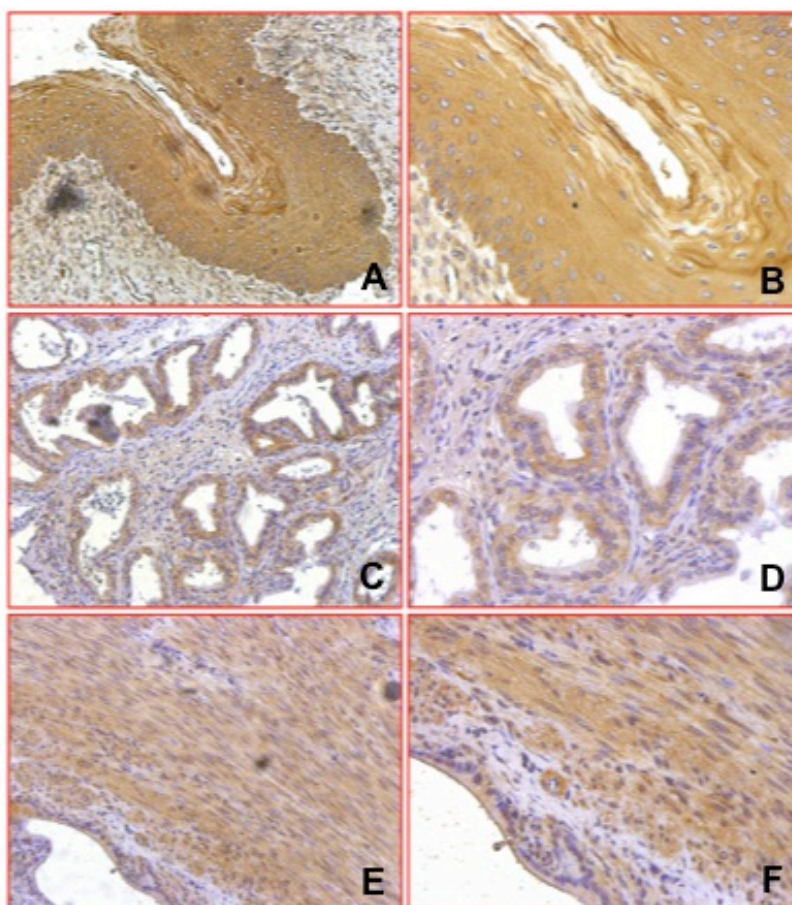


Figura 02: Detecção imunohistoquímica de receptores de i-NOS, sendo considerados citoplasmas positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. “A” receptores de i-NOS no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de i-NOS no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de i-NOS na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de i-NOS na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de i-NOS na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de i-NOS na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunohistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

5.2.3. Receptores FAS

Foram avaliadas imunomarcações para os receptores FAS na cérvix (Figura 3) de cadelas com piometra e em fases folicular e luteal do ciclo estral. Os resultados estão demonstrados nas tabelas 18 a 25.

TABELA 18: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de FAS na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>		Percentis			
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor MW
FAS_total	PA	4	4	4	0,582
	PF	4	4	4	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 19: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores FAS no epitélio luminal (FAS_luminal), região glandular (FAS_glandular) e região muscular (FAS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>		Percentis			
Região tecidual	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor M-W
FAS_luminal	PA	3	4	4	0,591
	PF	4	4	4	
FAS_glandular	PA	4	4	4	0,621
	PF	4	4	4	
FAS_muscular	PA	3	3	4	0,339
	PF	3	4	4	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 20: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1ºQuartil	Mediana	3ºQuartil	p-valor MW
FAS_total	PA	1	2	2	0,665
	PF	2	2	2	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 21: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS no epitélio luminal (FAS_luminal), região glandular (FAS_glandular) e região muscular (FAS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1ºQuartil	Mediana	3ºQuartil	p-valor M-W
FAS_luminal	PA	1	2	2	0,750
	PF	1	2	2	
FAS_glandular	PA	1	1	3	0,504
	PF	1	2	2	
FAS_muscular	PA	1	1	2	0,971
	PF	1	2	2	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

Não foi constatada diferença significativa na imunomarcção dos receptores FAS entre os grupos piometra aberta e piometra fechada.

TABELA 22: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de FAS na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
FAS_total	PI	4	4	4	0,607
	FF	4	4	4	
	FL	4	4	4	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 23: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de FAS no epitélio luminal (FAS_luminal), região glandular (FAS_glandular) e região muscular (FAS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>	Percentis				
	Região tecidual	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil
FAS_luminal	PI	4	4	4	0,988
	FF	3	4	4	
	FL	3	4	4	
FAS_glandular	PI	4	4	4	0,593
	FF	3	4	4	
	FL	4	4	4	
FAS_muscular	PI	3	3	4	0,979
	FF	2	4	4	
	FL	3	3	4	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 24: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
FAS_total	PI	1	2	2	0,015
	FF	1	1	1	
	FL	1	2	2	

Teste Kruskall-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 25: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS no epitelo luminal (FAS_luminal), região glandular (FAS_glandular) e região muscular (FAS_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
FAS_luminal	PI	1	2	2	0,715
	FF	1	1	2	
	FL	1	2	3	
FAS_glandular	PI	1	2	2	0,854
	FF	1	1	1	
	FL	2	2	2	
FAS_muscular	PI	1	2	2	0,481
	FF	1	1	1	
	FL	1	2	2	

Teste Kruskall-Wallis – considerando p-valor < 0,05

Foi constatada diferença significativa na imunomarcacão dos receptores FAS, sendo sua concentrao (intensidade) menor no grupo fase folicular quando comparado aos grupos piometra e fase luteal.

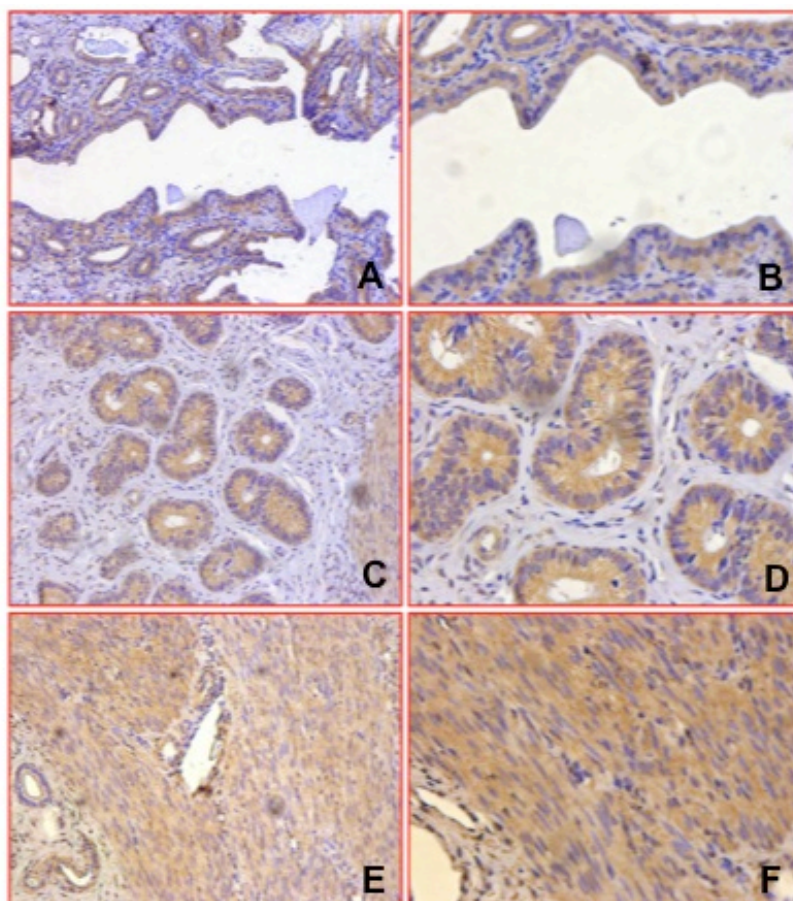


Figura 03: Deteco imunohistoquímica de receptores FAS, sendo considerados citoplasmas positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. "A" receptores de FAS no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; "B" receptores de FAS no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; "C" receptores de FAS na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; "D" receptores de FAS na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; "E" receptores de FAS na região muscular da cérvix aumento 200X; "F" receptores de FAS na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunohistoquímica, DAB, contra colorao hematoxilina de Harris.

5.2.4. Receptores FAS-L

Foram avaliadas imunomarcações de receptores FAS-L na cérvix (Figura 4) de cadelas com piometra e em fases folicular e luteal do ciclo estral. Os resultados estão demonstrados nas tabelas 26 a 33.

TABELA 26: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de FAS-L na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor MW
FAS-L_total	PA	2	3	4	0,035
	PF	4	4	4	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 27: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores FAS-L no epitélio luminal (FAS-L_luminal), região glandular (FAS-L_glandular) e região muscular (FAS-L_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor M-W
FAS-L_luminal	PA	0	3	4	0,091
	PF	4	4	4	
FAS-L_glandular	PA	4	4	4	0,148
	PF	4	4	4	
FAS-L_muscular	PA	2	3	4	0,158
	PF	3	4	4	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 28: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS-L na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor MW
FAS-L_total	PA	1	2	2	0,509
	PF	1	2	3	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 29: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS-L no epitélio luminal (FAS-L_luminal), região glandular (FAS-L_glandular) e região muscular (FAS-L_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor M-W
Região tecidual					
FAS-L_luminal	PA	0	1	2	0,123
	PF	1	2	2	
FAS-L_glandular	PA	1	1	2	0,696
	PF	1	1	3	
FAS-L_muscular	PA	1	2	3	0,203
	PF	1	3	3	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

Foi constatada diferença significativa na imunomarcção dos receptores FAS-L, sendo o grupo piometra fechada o mais imunomarcado quando comparado ao grupo piometra aberta.

TABELA 30: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de FAS-L na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
FAS-L_total	PI	3	4	4	0,634
	FF	4	4	4	
	FL	2	4	4	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 31: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de FAS-L no epitélio luminal (FAS-L_luminal), região glandular (FAS-L_glandular) e região muscular (FAS-L_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
FAS-L_luminal	PI	1	4	4	0,835
	FF	1	3	4	
	FL	0	4	4	
FAS-L_glandular	PI	4	4	4	0,587
	FF	4	4	4	
	FL	3	4	4	
FAS-L_muscular	PI	3	3	4	0,102
	FF	4	4	4	
	FL	2	3	4	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 32: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS-L na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
FAS-L_total	PI	1	2	2	0,547
	FF	1	2	2	
	FL	1	1	2	

Teste Kruskall-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 33: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de FAS-L no epitélio luminal (FAS-L_luminal), região glandular (FAS-L_glandular) e região muscular (FAS-L_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis					
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W	
Região tecidual						
	FAS-L_luminal	PI	1	1	2	0,523
		FF	1	1	1	
	FL	0	1	1		
FAS-L_glandular	PI	1	1	2	0,854	
	FF	1	2	2		
	FL	1	2	3		
FAS-L_muscular	PI	1	2	3	0,481	
	FF	1	2	3		
	FL	1	1	3		

Teste Kruskall-Wallis – considerando p-valor < 0,05

Não foi constatada diferença significativa na imunomarcacão dos receptores FAS-L entre os grupos piometra, fase folicular e fase luteal.

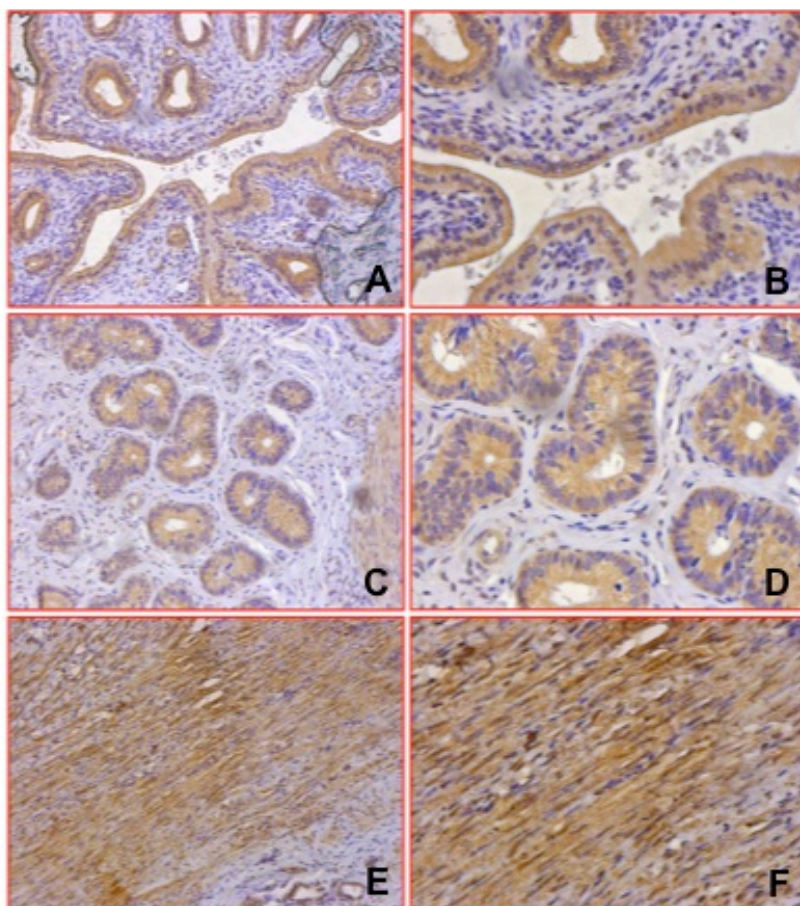


Figura 04: Detecção imunoistoquímica de receptores de FAS-L, sendo considerados citoplasmas positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. “A” receptores de FAS-L no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de FAS-L no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de FAS-L na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de FAS-L na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de FAS-L na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de FAS-L na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

5.2.5. Receptores PGF2 α -R

Foram avaliadas imunomarcações de receptores PGF2 α -R na cérvix (Figura 5) de cadelas com piometra e em fases folicular e luteal do ciclo estral. Os resultados estão demonstrados nas tabelas 34 a 41.

TABELA 34: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de PGF2 α -R na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>	Percentis				p-valor MW
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	
PGF2α-R_total	PA	2	3	4	0,103
	PF	3	4	4	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 35: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores PGF2 α -R no epitélio luminal (PGF2 α -R_luminal), região glandular (PGF2 α -R_glandular) e região muscular (PGF2 α -R_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>	Percentis				p-valor M-W
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	
PGF2α-R_luminal	PA	0	3	3	0,178
	PF	3	3	4	
PGF2α-R_glandular	PA	0	3	4	0,033
	PF	3	4	4	
PGF2α-R_muscular	PA	2	3	4	0,172
	PF	3	3	4	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 36: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de PGF2 α -R na c \acute{e} rvidas das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1$^{\circ}$Quartil	Mediana	3$^{\circ}$Quartil	p-valor MW
PGF2α-R_total	PA	1	1	1	0,007
	PF	1	2	2	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 37: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de PGF2 α -R no epit \acute{e} lio luminal (PGF2 α -R_luminal), regi \tilde{a} o glandular (PGF2 α -R_glandular) e regi \tilde{a} o muscular (PGF2 α -R_muscular) na c \acute{e} rvidas das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis					
	Regi\tilde{a}o tecidual	Grupo	1$^{\circ}$Quartil	Mediana	3$^{\circ}$Quartil	p-valor M-W
PGF2 α -R_luminal	PA		0	1	1	0,178
	PF		1	1	2	
PGF2 α -R_glandular	PA		0	1	1	0,005
	PF		1	2	2	
PGF2 α -R_muscular	PA		1	1	2	0,484
	PF		1	1	2	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

Foi constatada diferen \tilde{c} a significativa na imunomarcção dos receptores PGF2 α -R, sendo mais imunomarcadas a regi \tilde{a} o glandular do grupo piometra fechada quando comparado a mesma regi \tilde{a} o do grupo piometra aberta. A concentra \tilde{c} o (intensidade) dos receptores foi maior no grupo piometra fechada em rela \tilde{c} o ao grupo das abertas, assim como a concentra \tilde{c} o dos receptores na regi \tilde{a} o glandular do grupo piometra fechada foi maior em rela \tilde{c} o a mesma regi \tilde{a} o do grupo aberta

TABELA 38: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de PGF2 α -R na c ervix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>		Percentis			
	Grupo	1^oQuartil	Mediana	3^oQuartil	p-valor K-W
PGF2α-R_total	PI	2	3	4	0,500
	FF	2	3	4	
	FL	2	4	4	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 39: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de PGF2 α -R no ep t lio luminal (PGF2 α -R_luminal), região glandular (PGF2 α -R_glandular) e região muscular (PGF2 α -R_muscular) na c ervix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>		Percentis			
Região tecidual	Grupo	1^oQuartil	Mediana	3^oQuartil	p-valor K-W
PGF2 α -R_luminal	PI	2	3	3	0,277
	FF	0	2	3	
	FL	2	4	4	
PGF2 α -R_glandular	PI	2	4	4	0,506
	FF	2	4	4	
	FL	3	4	4	
PGF2 α -R_muscular	PI	3	3	4	0,341
	FF	2	3	3	
	FL	3	4	4	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 40: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de PGF2 α -R na c \acute{e} rvidas das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1$^{\circ}$Quartil	Mediana	3$^{\circ}$Quartil	p-valor K-W
PGF2α-R_total	PI	1	1	2	0,715
	FF	1	1	1	
	FL	1	1	1	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 41: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de PGF2 α -R no epit \acute{e} lio luminal (PGF2 α -R_luminal), regi \tilde{a} o glandular (PGF2 α -R_glandular) e regi \tilde{a} o muscular (PGF2 α -R_muscular) na c \acute{e} rvidas das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1$^{\circ}$Quartil	Mediana	3$^{\circ}$Quartil	p-valor K-W
PGF2α-R_luminal	PI	1	1	1	0,380
	FF	0	1	1	
	FL	1	1	2	
PGF2α-R_glandular	PI	1	1	2	0,879
	FF	1	1	1	
	FL	1	1	2	
PGF2α-R_muscular	PI	1	1	2	0,793
	FF	1	1	1	
	FL	1	1	1	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

N \tilde{a} o foi constatada diferen \tilde{c} a significativa na imunomarcção dos receptores PGF2 α -R entre os grupos piometra, fase folicular e fase luteal.

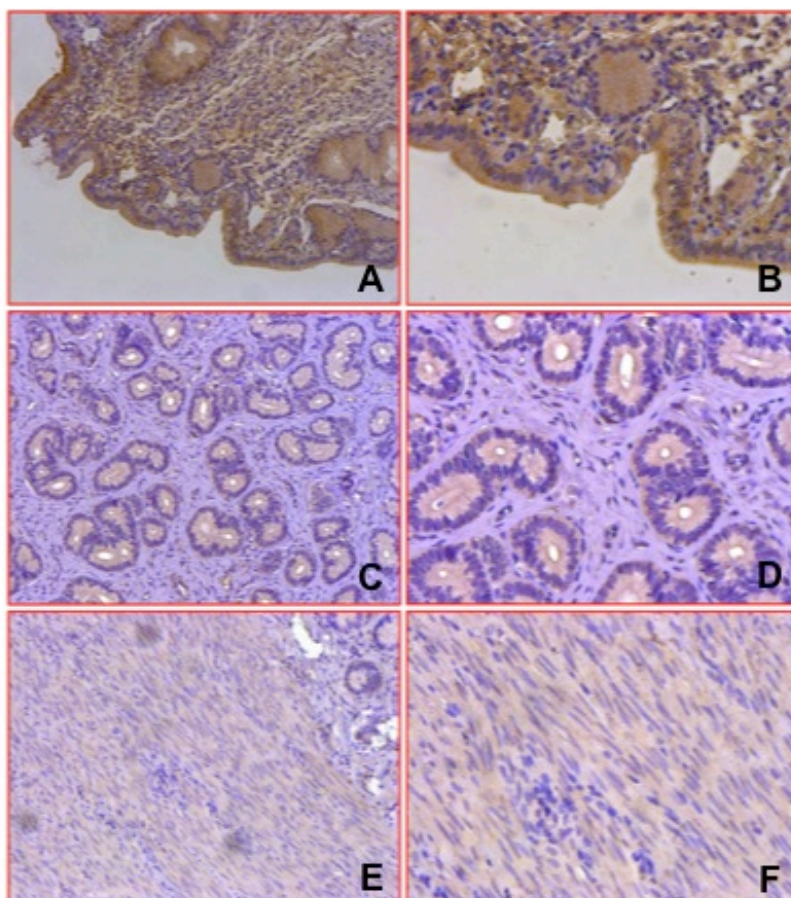


Figura 05: Detecção imunoistoquímica de receptores $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$, sendo considerados citoplasmas positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. “A” receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$ no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$ no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$ na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$ na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$ na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$ na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

5.2.6. Receptores COX-2

Foram avaliadas imunomarcações de receptores COX-2 na cérvix (Figura 6) de cadelas com piometra e em fases folicular e luteal do ciclo estral. Os resultados estão demonstrados nas tabelas 42 a 49.

TABELA 42: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de COX-2 na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>		Percentis			
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor MW
COX-2_total	PA	0	4	4	0,424
	PF	3	4	4	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 43: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores COX-2 no epitélio luminal (COX-2_luminal), região glandular (COX-2_glandular) e região muscular (COX-2_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>		Percentis			
Região tecidual	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor M-W
COX-2_luminal	PA	0	3	4	0,294
	PF	3	3	4	
COX-2_glandular	PA	0	4	4	0,221
	PF	4	4	4	
COX-2_muscular	PA	1	4	4	0,301
	PF	3	4	4	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 44: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de COX-2 na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor MW
COX-2_total	PA	0	2	3	0,296
	PF	1	3	3	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

TABELA 45: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de COX-2 no epitelo luminal (COX-2_luminal), região glandular (COX-2_glandular) e região muscular (COX-2_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor M-W
COX-2_luminal	PA	0	2	3	0,289
	PF	1	2	3	
COX-2_glandular	PA	0	2	3	0,048
	PF	2	3	3	
COX-2_muscular	PA	1	3	3	0,475
	PF	1	3	3	

Teste Mann-Whitney – considerando p-valor < 0,05

Foi constatada diferença significativa na imunomarco dos receptores COX-2, sendo maior a concentrao (intensidade) dos receptores na região glandular do grupo piometra fechada quando comparado a região do grupo piometra aberta.

TABELA 46: Valores medianos do escore positivo (imunomarcados) para receptores de COX-2 na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>	Percentis				
	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
COX-2_total	PI	3	4	4	0,715
	FF	4	4	4	
	FL	3	4	4	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 47: Valores medianos do escore positivos (imunomarcados) para receptores de COX-2 no epitélio luminal (COX-2_luminal), região glandular (COX-2_glandular) e região muscular (COX-2_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Positividade</i>	Percentis					
	Região tecidual	Grupo	1°Quartil	Mediana	3°Quartil	p-valor K-W
COX-2_luminal	PI		3	3	4	0,875
	FF		0	2	4	
	FL		0	4	4	
COX-2_glandular	PI		4	4	4	0,985
	FF		4	4	4	
	FL		3	4	4	
COX-2_muscular	PI		3	4	4	0,451
	FF		4	4	4	
	FL		4	4	4	

Teste Kruskal-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 48: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de COX-2 na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis				
	Grupo	1ºQuartil	Mediana	3ºQuartil	p-valor K-W
COX-2_total	PI	1	2	3	0,738
	FF	1	2	3	
	FL	2	3	3	

Teste Kruskall-Wallis – considerando p-valor < 0,05

TABELA 49: Valores medianos da intensidade de imunomarcção (nenhuma, fraca, moderada e forte) para receptores de COX-2 no epitélio luminal (COX-2_luminal), região glandular (COX-2_glandular) e região muscular (COX-2_muscular) na cérvix das cadelas dos grupos piometra (PI), fase folicular (FF) e fase luteal (FL). Botucatu, 2015.

<i>Intensidade</i>	Percentis					
	Grupo	1ºQuartil	Mediana	3ºQuartil	p-valor K-W	
Região tecidual						
	COX-2_luminal	PI	1	2	3	0,764
		FF	0	1	3	
	FL	0	2	3		
COX-2_glandular	PI	2	2	3	0,334	
	FF	1	2	3		
	FL	2	3	3		
COX-2_muscular	PI	1	3	3	0,987	
	FF	2	3	3		
	FL	2	3	3		

Teste Kruskall-Wallis – considerando p-valor < 0,05

Não foi constatada diferença significativa na imunomarco dos receptores COX-2 entre o grupo piometra, fase folicular e fase luteal.

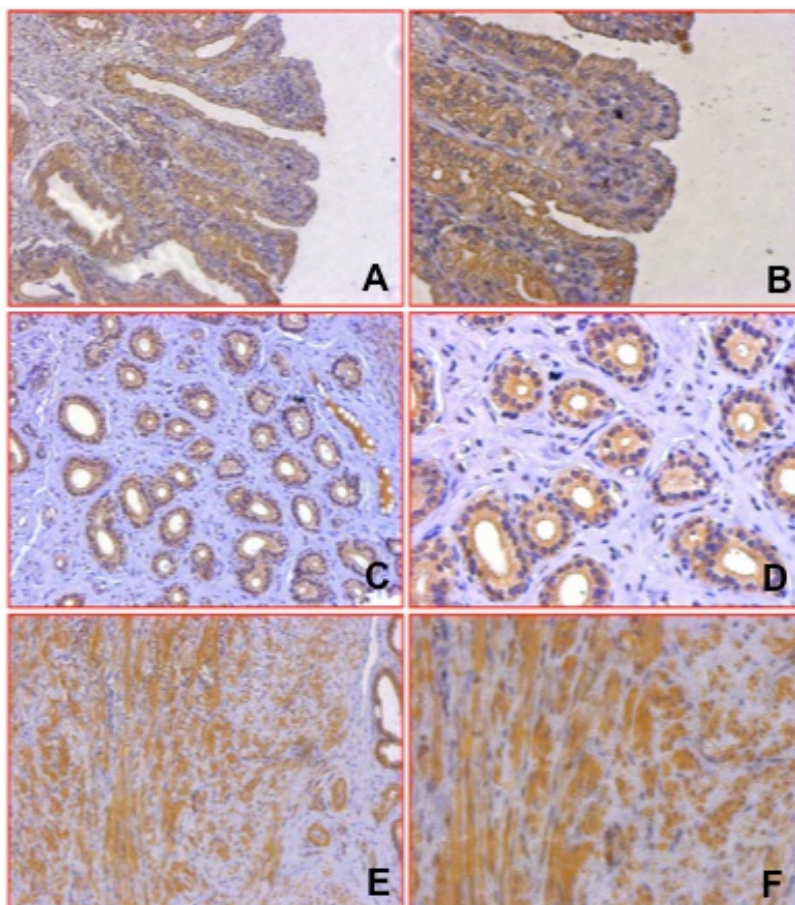


Figura 06: Detecção imunoistoquímica de receptores COX-2, sendo considerados citoplasmas positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. “A” receptores de COX-2 no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de COX-2 no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de COX-2 na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de COX-2 na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de COX-2 na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de COX-2 na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Esta pesquisa selecionou alguns fatores que podem estar envolvidos na abertura cervical em cadelas com piometra e em fase distintas do ciclo estral com a intenção de avançar na compreensão do relaxamento da cérvix. Neste experimento foram realizadas avaliações imunoistoquímicas da cérvix para a identificação e quantificação dos receptores e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2, em diferentes regiões da cérvix (epitelial, glandular e muscular) em cadelas saudáveis e com piometra.

A patogenia da piometra ainda não está completamente elucidada a despeito de inúmeros estudos a respeito do tema. Após décadas de pesquisa existe um consenso entre os autores sobre o envolvimento de uma ação hormonal somada a uma contaminação bacteriana. Sabe-se que a piometra é a enfermidade mais frequente em cadelas não castradas, adultas ou idosas e se não diagnosticada e tratada precocemente pode levar o animal a morte.

As piometras abertas são menos tóxicas e mais fáceis de serem tratadas do que os casos de piometra fechada, mas os mecanismos envolvidos na abertura e fechamento da cérvix não são conhecidos. Se esses mecanismos fossem esclarecidos poderia-se no mínimo estimular a abertura cervical e induzir a eliminação do conteúdo uterino, elevando a taxa de sucesso dos tratamentos.

A piometra é uma doença diagnosticada principalmente na fase do diestro do ciclo estral e mesmo com concentrações elevadas de progesterona a maioria dos casos de piometra é do tipo aberta. Com o objetivo de compreender melhor o mecanismo de abertura cervical nossos estudos foram focados em cadelas com piometra aberta e fechada e em cadelas saudáveis em fase folicular e luteal.

O grupo piometra aberta foi constituído por 11 animais, o diagnóstico foi realizado pelo histórico, anamnese, exame físico e exame clínico, sendo necessária a presença de secreção vulvar que poderia variar de purulenta a achocolatada para inclusão do animal neste grupo. O diagnóstico de piometra foi sempre confirmado por meio de exame ultrassonográfico e hemograma. O grupo piometra fechada, também foi constituído por 11 animais, o diagnóstico foi realizado da mesma maneira, mas os animais não apresentavam secreção

vulvar, apenas aumento do volume uterino com conteúdo diagnosticado através dos recursos de imagens. Os outros dois grupos estudados foram de cadelas saudáveis em fase folicular e luteal do ciclo estral. Durante o procedimento cirúrgico de OSH, os ovários foram observados macroscopicamente e as cadelas foram incluídas nos diferentes grupos pelo exame da presença de folículos ou corpos lúteos. A confirmação da fase do ciclo estral foi realizada posteriormente por meio da dosagem de progesterona sérica.

A média da dosagem de progesterona das cadelas com piometra aberta foi de 5,158ng/mL (variação de 0,286 a 18,593ng/mL) e das cadelas com piometra fechada foi de 7,3722 ng/mL (variação de 0,512 a 18,902ng/mL). Essa variação provavelmente foi devida a fase do ciclo estral em que o diagnóstico foi realizado; geralmente a piometra é diagnosticada na fase do diestro do ciclo estral, todavia em alguns casos esse diagnóstico pode ser realizado na fase de proestro, final do estro ou mesmo no anestro. Os resultados da correlação da concentração de progesterona com a piometra são controversos não havendo correspondência entre o tipo aberto ou fechado e os níveis de progesterona.

Weiss et al. (2004) analisaram a concentração de progesterona de cadelas com piometra e os resultados apresentaram diferenças significativas entre a piometra aberta e fechada, sendo de $4,8 \pm 0,9$ ng/mL para a piometra aberta e de $13,2 \pm 5,5$ ng/mL para a piometra fechada. Nos estudos realizados por Volpato (2011) e Tamada et al. (2012) entretanto, não foi observada diferença significativa entre as concentrações de progesterona e os grupos de cadelas com piometra aberta e fechada.

O grupo de fêmeas em fase folicular e luteal foi constituído de seis animais cada um. Para confirmar a inclusão das cadelas nos grupos, além da avaliação macroscópica do ovário após a OSH, foram realizadas dosagens hormonais de progesterona, sendo a média das fêmeas na fase folicular de 2,4945 ng/ml (variação de 0,932 a 5,730 ng/ml) e a média das cadelas em fase luteal foi de 10,3225 ng/ml (variação de 7,191 a 20,479 ng/ml). Esses resultados estão de acordo com os resultados de Concannon et al. (1975) e Benetti et al. (2004), provavelmente as cadelas incluídas na fase folicular do

ciclo apresentavam-se no proestro e ou início do estro e as fêmeas da fase luteal encontravam-se no diestro.

O mecanismo de abertura e fechamento cervical no caso da piometra canina pode estar envolvido com diversas interações hormonais, mas também pode ser devido a apenas um fator mecânico exercido pela pressão do acúmulo de secreção no interior do útero. Durante o curso da doença, algumas cadelas com piometra aberta podem apresentar um fechamento da cérvix, assim como cadelas com piometra fechada podem vir a apresentar abertura cervical. Esse mecanismo, qualquer que seja, pode ser ativado ou inibido durante a evolução da doença e necessita de maiores estudos.

Estudos sobre a ocorrência e a localização de receptores hormonais em útero e cérvix de cadelas já foram apontados como possíveis causas de relaxamento cervical. Segundo Kunkitti et al. (2011), os receptores de estrógeno e progesterona controlam a abertura e fechamento cervical durante o ciclo estral. Infelizmente segundo esses autores o mecanismo envolvido, as mudanças e associações bioquímicas que ocorrem durante esse processo não foram completamente elucidado. Volpato et al. (2012), utilizando a técnica de imunistoquímica, pesquisaram receptores de progesterona e estrógeno α e β no útero e cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada. O número de núcleos positivos para receptores de estrógeno e progesterona não diferiram entre as cadelas com piometra aberta e piometra fechada (KUNKITTI et al., 2011; VOLPATO et al., 2012), entretanto, Volpato et al. (2012) identificaram diferenças na marcação dos receptores de progesterona. Foi observado uma maior concentração de receptores de progesterona na cérvix de cadelas com piometra fechada. Esse resultado permitiu levantar a hipótese de que concentrações fisiológicas de progesterona poderiam ser suficientes para causar alteração na patência da cérvix em virtude de uma maior concentração local de receptores para esse hormônio. Mesmo não havendo diferenças importantes entre os níveis de progesterona nos tipos aberto ou fechado a concentração de receptores maior no caso das piometras fechadas poderia ser responsável pelo fechamento cervical.

A permeabilidade do colo do útero é importante para diversas situações clínicas como parto normal, parto prematuro, abortos patológicos, hidrometra, mucometra, hemometra e piometra. A possibilidade de controlar a abertura

cervical com o uso de medicamentos resultaria em melhores condições nas intervenções médicas. Posteriormente à revisão de literatura, um fluxograma foi proposto como hipótese da interferência de cada receptor estudado na cascata que leva ao relaxamento cervical (Figura 7). O ponto chave seria a quebra do colágeno recém sintetizado e a quebra das pontes químicas entre as fibras de colágeno.

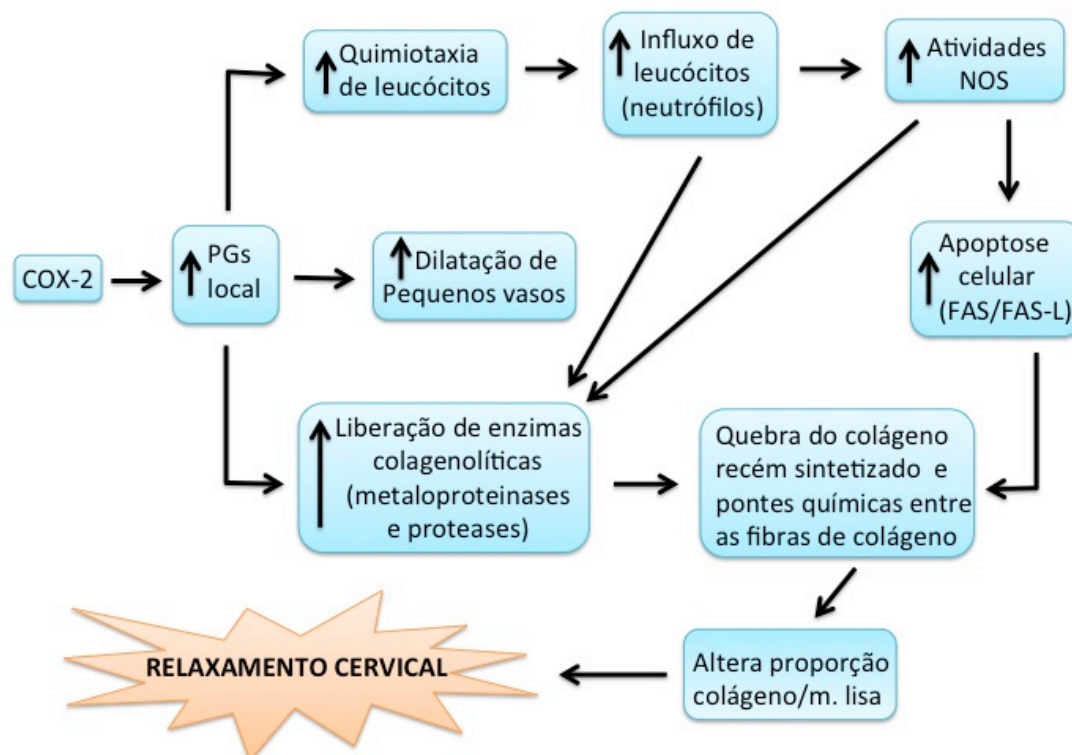


Figura 7: Fluxograma com a hipótese da interferência dos receptores estudados (e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2) na cascata que leva a abertura cervical. Adaptado de NUNES et al., 1999; BARBAS et al., 2001; KELLY, 2002; LERMA et al., 2008; CHATDARONG et al., 2010; KUNKITTI et al., 2011; TAMADA et al., 2012; KAUFMANN et al., 2012; HANSFORD et al., 2013; GOLBERG, 2014.

A avaliação imunoistoquímica empregada neste trabalho foi capaz de marcar com diferença de intensidade os citoplasmas das células que possuíam os receptores avaliados. Por ser uma técnica semiquantitativa, a presença e a intensidade da marcação refletem, respectivamente, a positividade da célula e

a concentração destes receptores. Na maioria dos trabalhos que tratam de avaliação imunoistoquímica, os autores avaliam o número de núcleos positivos e sua intensidade (BOOS et al., 1996; MARTIM et al., 2008; MARTIN, 2009), em outros trabalhos, entretanto, os pesquisadores avaliaram apenas a intensidade da marcação (ROBINSON et al., 2001) ou ainda apenas identificam o receptor (BREEVELD-DWARKASING et al., 2002).

Os receptores pesquisados nesse estudo foram identificados em todos os grupos avaliados. A identificação e a quantificação desses receptores foram realizadas da mesma maneira para todos os grupos. Inicialmente os grupos piometra aberta e fechada foram comparados entre si, levando-se em conta cada região da cérvix (luminal, glandular e muscular) separadamente e posteriormente foram somadas, primeiramente quanto a sua positividade e depois sobre sua intensidade de coloração. Uma segunda análise comparativa foi realizada, entre o grupo de cadelas saudáveis na fase folicular e na fase luteal e o grupo de cadelas com piometra.

O útero sofre alterações estruturais importantes durante o ciclo estral e a gestação. As células que regulam a contratilidade do músculo liso e a contração e a distensão espontânea do útero, são dependentes da óxido nítrico sintetase (NOS) (ROSSELLI et al., 1998).

Os dados relativos à regulação da síntese de oxido nítrico (ON) durante a gestação e o parto sugerem que a NOS é o jogador-chave na regulação da função contrátil do útero. Tem sido mostrado que existe um aumento nas atividades NOS em útero de ratas durante a prenhez e uma diminuição no momento do parto (NATUZZI et al., 1993). Resultado similar foi demonstrado em coelhos (SLADEK et al., 1993). Essa situação fornece evidências de que ON desempenha um papel importante no mecanismo de abertura e fechamento do colo uterino durante a prenhez e o parto podendo inclusive estar envolvida na remodelação do tecido conjuntivo.

Por esse motivo investigamos o papel do oxido nítrico nos mecanismos de abertura e fechamento cervical, através do mapeamento da expressão de e-NOS e i-NOS na cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada, e em fases folicular e lútea do ciclo estral. Até a presente data não existem muitas fontes na literatura acerca desse assunto na reprodução de carnívoros domésticos.

Os receptores e-NOS não apresentaram diferença entre os grupos piometra aberta e piometra fechada quanto a contagem total de células positivas, assim como quando as contagens foram realizadas separadamente por regiões da cérvix. Da mesma maneira, não houve diferença significativa quando comparamos os grupos de cadelas saudáveis na fase folicular, na fase luteal e com diagnóstico de piometra. Em contrapartida, foi observada uma intensidade maior de marcação na região glandular da cérvix para o receptor e-NOS no grupo piometra fechada quando comparado ao grupo piometra aberta. A somatória das regiões e as regiões luminal e muscular não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos de piometra. Quando comparamos o grupo piometra com os grupos de cadelas em fase folicular e fase luteal, não foi observada diferença na positividade de marcação entre os grupos, porém os grupos folicular e luteal, tem maior intensidade quando comparados ao grupo piometra.

No nosso estudo em cadelas, não houve diferença entre as fases do ciclo estral estudadas. O maior nível de expressão de e-NOS no útero de vacas foi medida no final do ciclo estral (LAPOINTE et al., 2006).

O ON é um mediador do relaxamento do músculo liso em vários tecidos, podendo modular a contratilidade por inibir enzimas cicloxigenase ou ativando prostanoídes. Pouco se sabe sobre os mecanismos de controle da expressão da NOS por sinais extracelular, na cérvix de mamífero (LAPOINTE et al., 2006).

Nossa pesquisa conseguiu identificar os receptores i-NOS em todos os animais utilizados, porém não houve diferença estatística nas análises comparativas. Foi investigado comparativamente o grupo piometra aberta e fechada quanto a sua positividade e intensidade não havendo diferença entre os grupos nem quando subdividimos as regiões da cérvix. Ao comparar as cadelas com diagnóstico de piometra com os grupos de fase folicular e fase luteal também nenhuma diferença estatística foi encontrada.

O papel fisiológico de e-NOS e i-NOS no útero de mulheres foi estudado por Buhimschi et al. (1996), que demonstraram que tanto e-NOS quanto i-NOS são reguladas durante a gravidez causando relaxamento do miométrio. As constatações destes pesquisadores fornecem evidências convincentes de que o ON faz parte do controle da contratilidade uterina.

A relevância fisiológica e biológica de ON durante a gestação e o trabalho de parto em ratos vem da constatação de que a inibição da síntese de ON prolongou a duração do parto, o intervalo entre cada filhote nascido e diminuiu a extensibilidade cervical (ROSSELLI et al., 1998).

O resultado do nosso experimento foi exatamente o contrário do esperado, ou seja, esperávamos encontrar mais receptores para NOS no grupo piometra aberta, pois uma maior quantidade de NOS aumentaria a liberação de enzimas colagenolíticas (metaloproteinases e proteases) quebrando assim as pontes químicas entre as fibras de colágenos, alterando a proporção colágeno/musculatura lisa causando o relaxamento da cérvix. Nosso resultados corroboram com Natuzzi et al. (1993) e Sladek et al. (1993) que encontraram menos receptores NOS no momento do parto de ratas e coelhas, respectivamente, momento esse onde a cérvix se encontra aberta. Não conseguimos comprovar que e-NOS e i-NOS tenham uma participação clara no mecanismo de relaxamento cervical em cadelas.

A NOS é um importante mediador na ação de hormônios e neurotransmissores que são vitais para a regulação da reprodução (DIXIT e PARVIZI, 2001). No entanto, a maior parte dos dados provenientes desses estudos é realizada em ratos e seres humanos e um papel direto do ON no controle da reprodução em animais domésticos é especulativo. É possível que o NOS desempenhe um importante papel na regulação das funções reprodutivas femininas. No entanto, uma busca na literatura revelou que existe uma escassez de informação sobre a distribuição e localização de NOS.

O FAS é um receptor trimérico de plasma ligado à membrana de superfície sendo expresso na maioria dos tipos celulares. Além da apoptose, o FAS pode desencadear várias vias de sinalização não apoptóticas, assim como vias que promovem a ativação das células e proliferação celular (KAUFMANN et al. 2012). Ao avaliar a imunomarcagem e sua intensidade, não foi constatada diferença estatística entre o grupo piometra aberta e fechada. Quando comparamos o grupo piometra com os grupos fase folicular e fase luteal, não houve diferença estatística quanto a positividade da marcação, mas ao avaliar a intensidade da coloração, o que está diretamente relacionada a concentração dos receptores, a cérvix de cadelas em fase folicular apresentaram uma menor concentração de receptores que as cadelas com diagnóstico de piometra e em

fase luteal na somatório das regiões avaliadas. Quando examinamos a região luminal, glandular e muscular separadamente, não houve diferença estatística entre os grupos piometra, fase folicular e fase luteal.

O sistema FAS/FASL desempenha um papel importante na regulação da homeostase fisiológica do sistema imunitário. Quando comparamos a imunorreatividade dos receptores FAS-L, o grupo piometra fechada foi maior quanto a positividade dos receptores quando comparada ao grupo piometra aberta. Ao dividir as regiões da cérvix em luminal, glandular e muscular não houve diferença estatística, assim como não houve diferença entre os grupos ao analisar a intensidade da marcação. Quando a comparação ocorreu entre o grupo piometra e os grupos de cadelas em fase folicular e luteal, não houve diferenças estatísticas na positividade e na intensidade, tanto no total quanto nas diferentes regiões da cérvix.

A função de FAS-L é mediada pela metaloproteases, podendo ter atividades não apoptóticas, tais como a indução de resposta inflamatória (TRAMBAS e GRIFFITHS, 2003; WILSON et al., 2009). Duas hipóteses foram levantadas ao estudarmos os receptores de FAS e FAS-L. A primeira é que encontraríamos mais receptores no grupo piometra fechada por serem mais tóxicas e com processos inflamatórios mais exacerbados. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto aos receptores FAS, mas FAS-L foi maior no grupo piometra fechada quando a análise foi realizada com a positividade somada de todas as camadas. Outra hipótese era de encontrarmos mais receptores FAS e FAS-L no grupo piometra aberta pois sua principal ação, que é a apoptose, poderia consumir o colágeno recém sintetizado, alterando a relação colágeno/musculatura lisa fazendo o relaxamento cervical, o que não pode ser concluído.

Selam et al. (2001) demonstraram que a regulação da expressão de FAS-L no endométrio humano é ciclo dependente. A expressão de FAS-L no estroma endometrial e nas células glandulares é regulada por estrógeno e progesterona. Pelos resultados do nosso experimento, essa hipótese não foi confirmada em cadelas.

As prostaglandinas atuam nos fibroblastos da cérvix estimulando a síntese de glicosaminoglicanos. Sugere-se que o mecanismo pelo qual as prostaglandinas induzem o relaxamento cervical é complexo e não envolve

apenas o relaxamento muscular, mas também o envolvimento de componentes de matriz extracelular segregados por fibroblastos (KERSHAW et al., 2009).

Há poucas informações disponíveis na influência das prostaglandinas sobre a composição celular do tecido cervical. Se as prostaglandinas endógenas desempenham um papel na fisiologia do amadurecimento e dilatação da cérvix, é de se esperar que os níveis de prostaglandinas devam estar altos no tecido cervical em situações de relaxamento cervical.

Em nosso estudo os resultados mais expressivos entre os grupos piometra aberta e fechada foram dos receptores de $PGF2\alpha$ -R. Estes receptores apresentaram-se em maior quantidade na região glandular do grupo piometra fechada em relação ao grupo piometra aberta. Além disso, sua intensidade de marcação foi maior no grupo piometra fechada tanto na somatória das regiões da cérvix quanto na porção glandular. Não houve diferença estatística entre os grupos piometra aberta e fechada ao avaliar a positividade total e as regiões luminal e muscular, assim como a intensidade nas regiões luminal e glandular. Quando comparamos o grupo piometra com os grupos fase folicular e fase luteal, não houve diferença estatística.

O efeito da ocitocina em relaxamento cervical em vacas é mediada por um aumento local de COX-2 e um subsequente aumento da síntese de prostaglandinas (SHEMESH et al., 1997). Em nosso estudo não foi notado aumento nos receptores de prostaglandinas no grupo piometra de cérvix aberta; o grupo piometra fechada foi que apresentou o maior número de receptores. Quando comparado o grupo piometra com o grupo da fase folicular e luteal não houve diferença estatística.

Esse resultado também não era esperado, um maior número de receptores de prostaglandina deveria ser encontrado nos animais com a cérvix relaxada. As prostaglandinas aumentam a quimiotaxia para leucócitos, causam dilatação de pequenos vasos e aumentam a liberação de metaloproteinases e proteases, processos esses responsáveis pelo relaxamento cervical.

A proposta de que a prostaglandina interfere diretamente sobre a ação dos leucócitos foi estudada por Volpato et al. (2013). Neste trabalho, utilizando seis cadelas com piometra aberta e seis cadelas com piometra fechada, não foi encontrada diferença significativa entre o infiltrado leucocitário observado na cérvix de cadelas com piometra aberta ou fechada, tanto no total dos leucócitos

como na quantificação de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos e plasmócitos. De acordo com os resultados a infiltração leucocitária não está associada a abertura cervical na piometra canina.

Ao analisar o muco do colo do útero de mulheres para PGE2 e PGF2 α durante o período de relaxamento cervical e em períodos normais, não foi encontrada diferença na concentração conforme era esperado (PLATZ-CHRISTENSEN et al., 1997). Esses resultados corroboram com nosso trabalho. Ao pesquisarmos receptores de PGF2 α em cadelas em diferentes fases do ciclo estral não encontramos diferenças significativas entre elas.

Clínica e experimentalmente tem-se demonstrado a eficácia das prostaglandinas sintética no amadurecimento cervical e indução do trabalho de parto, provando que essas substâncias são agentes farmacológicos importantes em obstetrícia humana (MACEDO et al., 1998).

Foi levantada a hipótese de que a prostaglandina sintetizada nos tecidos adjacentes podem difundir-se para a cérvix afetando sua estrutura e função. Este parece ser um mecanismo importante pelo qual as prostaglandinas atuam durante a fase ativa do trabalho de parto, quando a cérvix progressivamente se abre, pois, é fato bem documentado o seu envolvimento no mecanismo de regulação da abertura cervical (HERTELENDY E ZAKAR, 2004). Essa hipótese explicaria nossos resultados de não encontrarmos um aumento dos receptores de prostaglandinas no tecido cervical nos casos de piometra aberta e fase folicular do ciclo estral.

Gogny et al. (2010) forneceram a primeira evidencia *in vitro* da participação dos receptores de PGF2 α nas contrações uterinas, indicando a expressão funcional de tais receptores no miométrio do útero de cadelas. A PGF2 α induziu uma resposta contráctil mais forte nas fibras longitudinais do que nas fibras circulares do miométrio. Estes resultados sugerem que existe uma diferença na sensibilidade à PGF2 α ou uma distribuição heterogênea de receptores PGF2 α nas camadas do miométrio de cadelas. No entanto, o mecanismo responsável pela diferença na resposta contráctil entre as duas camadas musculares ainda tem que ser determinado.

Informações detalhadas sobre a expressão de enzimas biossintéticas prostanóides e receptores de prostaglandinas são necessárias para alcançar uma melhor compreensão da ação da prostaglandina na remodelação do colo

do útero e para a concepção de terapias eficazes para o tratamento de incompetência cervical. Apesar da visão generalizada de que prostaglandinas desempenham um papel-chave na promoção das contrações uterinas e o amadurecimento do colo do útero, o modo pelo qual agem ainda é pouco compreendido (HERTELENDY e ZAKAR, 2004).

A distribuição de COX em tecidos é complexa. Ambas as isoformas, COX-1 e COX-2, estão presentes em muitos tecidos normais e em várias condições patológicas (ZIDAR et al., 2009). O relaxamento cervical no estro é induzido por hormônios ovarianos e hipofisários estimulando a produção local de prostaglandina E2 por meio de uma via biossintética que envolve um número de mediadores incluindo COX-2 (FALCHI e SCARAMUZZI, 2013).

Ao avaliar as imunomarcações dos receptores COX-2 em nosso estudo, não houve diferença estatística quanto a positividade quando comparamos o grupo piometra aberta e fechada. Quando pesquisamos sobre a intensidade da marcação, notamos que na região glandular a marcação imunoistoquímica é mais intensa no grupo piometra fechada comparativamente ao grupo piometra aberta, não havendo diferenças estatísticas quando comparamos os grupos nos estudos das regiões luminal e muscular e na somatória das três regiões. Ao comparar o grupo piometra aos grupos de cadelas na fase folicular e na fase luteal, não observamos diferenças estatísticas na positividade e nem na intensidade.

No estudo de Silva et al. (2010), foram estudadas as enzimas COX-1 e COX-2 no útero de cadelas normais e com piometra. COX-1 foi significativamente maior em cadelas com piometra do que no endométrio normal, porém foi observada em ambas, cadelas normais e com piometra. A enzima COX-2 só estava presente no útero de cadelas com piometra. Em nosso estudo foi evidenciada marcação imunoistoquímica de COX-2 em todas as cadelas com o diagnóstico de piometra e nas fases folicular e luteal do ciclo estral.

A expressão dos genes de COX-2 na cérvix de cadelas cíclicas e com piometra foi estudada por Linharattanaruksa et al. (2013). Nas fêmeas cíclicas normais durante todas as fases do ciclo estral, assim como nas cadelas com piometra, COX-2 foi expresso, no entanto, não foram observadas diferenças em suas expressões. Concluiu-se que a expressão de COX-2 na cérvix não

sofre influencia dos hormônios ovarianos. Esse trabalho corrobora com os nossos dados não havendo diferenças estatísticas entre os grupos de cadelas com o diagnóstico de piometra e nas fases folicular e luteal do ciclo estral.

Em ratas, a análise de COX-2 nas diferentes fases do ciclo estral (diestro, proestro, estro e metaestro) revelou um maior nível na fase do estro em comparação com as outras fases. A maneira como se regula e o papel de cada enzima COX, durante a gestação e o ciclo estral no útero de rato não foram completamente esclarecidas (ST-LOUIS et al., 2010).

St-Louis et al. (2010) e Reese et al. (2000) relataram um aumento da expressão de COX no útero de ratas no momento do parto. COX é uma fonte importante de prostaglandinas durante o parto sendo essencial para a abertura cervical. Nossa hipótese compartilha com esses resultados.

Em vacas, o efeito da ocitocina no relaxamento cervical é mediada por um aumento local de COX-2 e, um subsequente, aumento da síntese de prostaglandinas (SHEMESH et al. 1997). Em ovelhas um aumento da expressão de COX-2 foi relatado na cérvix durante a fase folicular do ciclo estral (KERSHAW et al. 2007).

Atualmente muitos estudos estão sendo realizados com receptores no útero e cérvix de cadelas normais e com HCE/piometra, entretanto, ainda não foi possível elucidar por completo o mecanismo de abertura ou fechamento da cérvix nessa condição.

Novos estudos são necessários abordando ainda o mecanismo de abertura e fechamento cervical. Avaliações das proporções de colágeno e fibras musculares conforme o considerado por Chatdarong et al. (2010), além da análise da direção dessas fibras, talvez seja uma opção para o estudo da abertura cervical, bem como o exame histológico comparativo da cérvix durante o trabalho de parto.

A piometra é uma doença frequente nas cadelas e a despeito de décadas de pesquisa ainda são necessários estudos utilizando ferramentas mais sofisticadas e grupos de animais em fases hormonais bem definidas. Embora as características clínicas da piometra sejam bem reconhecidas, ainda pouco se sabe em relação às alterações moleculares que ocorrem durante o desenvolvimento dessa doença. No futuro, os resultados de experiências

devem incluir ensaios moleculares que irão demonstrar claramente os fundamentos genéticos da doença inflamatória (KEMPISTY et al., 2013).

O amadurecimento e a posterior dilatação da cérvix é um mecanismo complexo que envolve a mudança da anatomia macroscópica e estrutura histológica, propriedades mecânicas e composição bioquímica (HERTELENDY E ZAKAR, 2004).

De fato, no amadurecimento cervical de cadelas com piometra, existem muitos aspectos de um processo de remodelação do tecido inflamatório e quebra de pontes químicas entre as fibras de colágeno. Agentes inflamatórios tais como IL-1, fator de necrose tumoral alfa e IL-8 parecem estar envolvidos e necessitam de futuras pesquisas. Já durante o trabalho de parto o mecanismo pode ser outro envolvendo hormônios esteroides, prostaglandinas e ocitocina. Além disso, o relaxamento cervical durante a fase folicular do ciclo estral pode ainda ser motivado por outras relações hormonais sem o envolvimento direto das prostaglandinas.

Os resultados obtidos mostram a importância do assunto e a dificuldade de se demonstrar com clareza as relações endócrinas, parácrinas e inflamatórias possivelmente envolvidas no mecanismo de relaxamento cervical.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Levando em consideração os objetivos propostos podemos concluir que:

- ✓ Os receptores e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2 estão presentes em todos os grupos avaliados (piometra aberta, piometra fechada, cadelas saudáveis em fase folicular e em fase luteal), sendo localizados em todas as regiões da cérvix (luminal, glandular e muscular).
- ✓ Os receptores i-NOS e FAS comportam-se da mesma maneira em cadelas com piometra aberta e fechada, não estando envolvidos no mecanismo de abertura cervical nessa doença.
- ✓ Os receptores e-NOS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2 foram encontrados em maior quantidade no grupo piometra fechada quando comparados ao grupo piometra aberta, sugerindo o envolvimento no mecanismo de abertura/fechamento cervical.
- ✓ Os receptores i-NOS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2 não se mostraram diferentes nos grupos piometra, cadelas saudáveis em fase folicular e em fase luteal, sugerindo sua independência hormonal nas cadelas.
- ✓ O receptor e-NOS foi inferior nas cadelas com piometra quando comparados aos grupos de cadelas saudáveis em fase folicular e em fase luteal, podendo estar correlacionado a presença de infiltrado inflamatório.
- ✓ O receptor FAS foi inferior no grupo de cadelas saudáveis em fase folicular quando comparado as cadelas com piometra e cadelas saudáveis em fase luteal, podendo estar relacionado a concentração de progesterona e ser ciclo dependente.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ACHACHE, H.; REVEL, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. **Human Reproduction**. v.12, p.731–46, 2006.

ANDERSON, W.F.; UMAR, A.; VINER, J.L. The role of cyclooxygenase inhibitors in cancer prevention. **Current Pharmacetical Design**. v.8, p.1035–62, 2002.

BARBAS, J.P.; GONÇALVES, S.C.; MARQUES, C.C.; HORTA, A.E.M. Efeito da aplicação vaginal de agentes dilatadores do cérvix durante a fase folicular do ciclo em ovelhas. **Proceedings do III Congresso Ibérico de Reprodução Animal**. p.299-307, 2001.

BARTOSKOVA, A.; VITASEK, R.; LEVA, L.; FALDYNA, M. Hysterectomy leads to fast improvement of haematological and immunological parameters in bitches with pyometra. **Journal of Small Animal Practice**. v.48, p.564–8, 2007.

BEISNER, D.R.; CHU, I.H.; ARECHIGA, A.F.; HEDRICK, S.M.; WALSH, C.M. The requirements for Fas-associated death domain signaling in mature T cell activation and survival. **The Journal of Immunology**. v.171, p.247-56, 2003.

BENETTI, A. H.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J.A. Concentrações séricas de progesterona, 17 β -estradiol e cortisol durante o final do próestro, estro e diestro gestacional em cadelas. **Ciência Rural**. v.34, n.2, p.471-8, 2004.

BOOS, A.; MEYER, W.; SCHWARZ, R.; GRUNERT, E. Immunohistochemical assesment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 44, p. 11-21, 1996.

BREEVELD-DWARKASING, V.N.A.; BOER-BROUWER, M.; MÖSTL, E.; SOEDE, N.M.; WEIJDEN, G.C.; TAVERNE, M.A.M.; DISSEL-EMILIAN, F.M.F. Immunohistochemical distribution of oestrogen and progesterone receptors and tissue concentrations of oestrogens in the cervix of non-pregnant cows. **Reproduction, Fertility and Development**. v.14, p.487-94, 2002.

BYERS, C.G.; WILLIAMS, J.E.; SAYLOR, D.K. Pyometra with inguinal herniation of the left uterine horn and omentum in a Beagle dog. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**. v.17, n.1, p.86–92, 2007.

BUKOWSKI, R.; MCKAY, L.; SHI, S.Q.; SAADE, G.R.; GARFIELD, R.E. The effects of cervical application of inhibitors of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-1, and cyclooxygenase-2 on delivery in rats. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. v.185, p.959–65, 2001.

BUHIMISCHI, I.; ALI, M.; JAIN, V. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. **Humam Reproduction**. v.11, p.1755–66, 1996.

CARLI, C.; METZ, C.N.; AL-ABED, Y.; NACCACHE, P.H.; AKOUM, A. Up-Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Production in Human Endometriotic Cells by Macrophage Migration Inhibitory Factor: Involvement of Novel Kinase Signaling Pathways. **Endocrinology**. v.150, p.3128–37, 2009.

CHANDRAPURIA, V.P.; SOMIL, R. Canine Pyometra - A Report of 10 Cases. **Intas Polivet**. v.5, n.1, p.157-9, 2014.

CHATDARONG, K.; KUNKITTI, P.; SRISUWATANASAGUL, S. P2 Distribution of Oestrogen Receptor and Progesterone Receptor and Leukocyte Infiltration in Canine Cervical Tissue. **Proceedings 7th Chulalongkorn University Veterinary Science the Animal Company**. v.1, p.58, 2008.

CHATDARONG, K.; LINHARATTANARUKSA, P.; SIRIVAIIDYAPONG, S.; SRISUWATAMASAKUL, S. The proportions of Smooth Muscle and Collagen in the Cervical Tissue of Bitches during Various Stages of the Estrous Cycle and Bitches Developing. **Proceedings 9th Chulalongkorn University Veterinary Science the Animal Company**. v.1, p.129, 2010.

CONCANNON, P.W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science**. v.124, p.200–10, 2011.

CONCANNON, P.W.; HANSEL, W.; VISEK, W.J. The ovarian cycle of bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. **Biology of Reproduction**. v.13, p.112-21, 1975.

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

DE COCK, H.; VERMEIRSCH, H.; DUCATELLEL, R.; DE SCHEPPER, J. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cystic-endometritis-pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**. v.48, p.1035-47, 1997.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; VAN DEN BROECK, W. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected. **Theriogenology**. v.55, p.1509-19, 2001.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; CORYN, M. Estrogen and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. **Animal Reproduction Science**. v.70, p.251–9, 2002.

DIXIT, V.D.; PARVIZI, N. Nitric oxide and the control of reproduction. **Animal Reproduction Science**. v.65, p.1–16, 2001.

DOW, C. The cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **The Veterinary Record**. v.70, p.1102-8, 1958.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **The Veterinary Record**. v.69, p.1409-15, 1957.

EGENVALL, A.; HAGMAN, R.; BONNETT, B.N.; HEDHAMMAR, A.; OLSON P.; LAGERSTEDT, A.S. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.15, p.530-8, 2001.

ENGINLER, S.O.; ATES, A.; SİG, B.D.; SONTAS, B.H.; SOĞANMEZ, K.; KARAC, E.; EKICI, H.; DAL, G.E.; GUĞAN, A. Measurement of C-reactive protein and Prostaglandin F2a Metabolite Concentrations in Differentiation of Canine Pyometra and Cystic Endometrial Hyperplasia/Mucometra. **Reproduction Domestic Animal**. v.49, p.641-7, 2014.

FALCHI, L.; SCARAMUZZI, R.J. The expression of ER α , OTR, cPLA 2, COX-2, and PPAR γ in the cervix of the ewe during the estrous cycle. **Theriogenology**. v.79, p.40-7, 2013.

FIENI, F.; TOPIE, E.; GOGNY, A. Medical Treatment for Pyometra in Dogs. **Reproduction Domestic Animal**. v.49, n.2, p.28-32, 2014.

GOERICKE-PESCH, S.; SCHMIDT, B.; FAILING, K.; WEHREND, A. Changes in the histomorphology of the canine cervix through the oestrus cycle. **Theriogenology**, v.74, n.6, p.1075-81, 2010.

GOGNYA, A.; MALLEMB, Y.; DESTRUMELLEA, S.; THORINB, C.; DESFONTISB, J.C.; GOGNYB, M.; FIÉNIA, F. In vitro comparison of myometrial contractility induced by aglepristone-oxytocin and aglepristone-PGF2 α combinations at different stages of the estrus cycle in the bitch. **Theriogenology**. v.74, p.1531-8, 2010.

GOLDBERG, A.E. Role of various hormones in the process of cervical ripening. Disponível em : <<http://emedicine.medscape.com/article/263311-overview#aw2aab6b5>> Acesso em: 12 de julho, 2014.

HAGMAN, R. Clinical and Molecular Characteristics of Pyometra in Female Dogs. **Reproduction Domestic Animal**. v.47, n.6, p.323–5, 2012.

HAGMAN, R.; REEZIGT, B.J.; LEDIN, H.B.; KARLSTAM, E. Blood lactate levels in 31 female dogs with pyometra. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.51, n.2, p.11-9, 2009.

HAGMAN, R.; KINDHAL, H.; FRANSSON, B.A.; BERGSTROM, A.; HOLST, B.S.; LAGERSTEDT, A.S. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2alpha metabolite analysis. **Theriogenology**. v.66, n.2, p.196-206, 2006a.

HAGMAN, R.; KINDHAL, H.; LAGERSTEDT, A.S. Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F2alpha metabolite levels. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.47, n.1, p.55-67, 2006b.

HANSFORD, J.R.; PAL, M.; POPLAWSKI, N.; HAAN, E.; BOOG, B.; FERRANTE, A.; DAVIS, J.; NIEMELA, J.E.; RAO, V.K.; SUPPIAH, R. In utero and early postnatal presentation of autoimmune lymphoproliferative syndrome in a family with a novel FAS mutation. **Haematologica**. v.98, p.38-9, 2013.

HAYASHIA, K.G.; HOSOEB, M.; TAKAHASHIA, T. Placental expression and localization of endothelin-1 system and nitric oxide synthases during bovine pregnancy. **Animal Reproduction Science**. v.134, p.150-7, 2012.

HERTELENDYA, F.; ZAKARB, T. Prostaglandins and the myometrium and cervix. **Science direct - Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v.70, p.207–22, 2004.

JITPEAN, S.; STRÖM-HOLST, B.; HÖGLUND, O.V.; PETTERSSON, A.; OLSSON, U.; STRAGE, E.; SÖDERSTEN, F.; HAGMAN, R. Serum insulin-like growth factor-I, iron, C-reactive protein, and serum amyloid A for prediction of outcome in dogs with pyometra. **Theriogenology**. v.82, p.43–8, 2014a.

JITPEAN, S.; STRÖM-HOLST, B.; EMANUELSON, U.; HÖGLUND, O.V.; PETTERSSON, A.; ALNERYD-BULL, C.; HAGMAN, R. Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. **BioMed Central Veterinary Research**. v.10, n.6, p.1-12, 2014b.

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

JURKA, P.; MAX, A.; HAWRYNSKA, K.; SNOCHOWSSKI, M. Age-related pregnancy results and further examination of bitches after aglepristone treatment of pyometra. **Reproduction Domestic Animal**. v.45, p.525–9, 2010.

KAYISLI, U.A.; SELAM, B.; GUZELOGLU-KAYISLI, O.; DEMIR, R.; ARICI, A. Human Chorionic Gonadotropin Contributes to Maternal Immunotolerance and Endometrial Apoptosis by Regulating Fas-Fas Ligand System. **The Journal of Immunology**. v.171, p.2305-13, 2003.

KAUFMANN, T.; STRASSER, A.; JOST, P.J. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. **Cell Death and Differentiation**. v.19, p.42–50, 2012.

KELLY, R.W. Inflammatory mediators and cervical ripening. **Journal of Reproductive Immunology**. v.57, p.217–24, 2002.

KEMPISTY, B.; BUKOWSKA, D.; WOZNA, M.; PIOTROWSKA, H.; JACKOWSKA, M.; ZURAW, A.; CIESIOLKA, S.; ANTOSIK, P.; MARYNIAK, H.; OCIEPA, E.; POROWSKI, SZ.; BRUSSOW, K.P.; JASKOWSKI, J.M.; NOWICKI, M. Endometritis and pyometra in bitches: a review. **Veterinari Medicina**. v.58, n.6, p.289-97, 2013.

KERSHAW, C.M.; SCARAMUZZI, R.J.; MCGOWAN, M.R.; WHEELER-JONES, C.P.; KHALID, M. The expression of prostaglandin endoperoxide synthase 2 messenger RNA and the proportion of smooth muscle and collagen in the sheep cervix during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**. v.76, p.124–9, 2007.

KERSHAW, C.M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M.R.; PITSILLIDES, A.A.; SCARAMUZZI, R.J. The mRNA expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and the changes in glycosaminoglycans in the sheep cervix during the estrous cycle. **Theriogenology**. v.72, p.251–61, 2009.

KUNKITTI, P.; SRISUWATANASAGUL, S.; CHATDARONG, K. Distribution of estrogen receptor alpha and progesterone receptor, and leukocyte infiltration in the cervix of cyclic bitches and those with pyometra. **Theriogenology**. v.75, p.979-87, 2011.

LAPOINTE, J.; ROY, M.; ST-PIERRE, I.; KIMMINS, S.; GAUVREAU, D.; MACLAREN, L.A.; BILODEAU, J.F. Hormonal and Spatial Regulation of Nitric Oxide Synthases (NOS) (Neuronal NOS, Inducible NOS, and Endothelial NOS) in the Oviducts. **Endocrinology**. v.147, n.12, p.5600–10, 2006.

LEDINGHAM, M.A.; THOMSON, A.J.; YOUNG, A.; MACARA, L.M.; GREER, I.A.; NORMAN, J.E. Changes in the expression of nitric oxide synthase in the human uterine cervix during pregnancy and parturition. **Molecular Human Reproduction**. v.6, p.1041–8, 2000.

LEETHONGDEE, S.; KHALID, M.; BHATTI, A.; PONGLOWHAPAN, S.; KERSHAW, C.M.; SCARAMUZZI, R.J. The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. **Theriogenology**. v.67, p.767–77, 2007.

LERMA, E.; ROMERO, M.; GALLARDO, A.; PONS, C.; MUÑOZ, J.; FUENTES, J.; LLOVERAS, B.; CATASUS, L.; PRAT, J. Prognostic significance of the Fas receptor/Fas-ligand system in cervical squamous cell carcinoma. **Virchows Arch.** v.452, p.65-74, 2008.

LINHARATTANARUKSA, P.; SRISUWATANASAGUL, S.; PONGLOWHAPAN, S.; KHALID, M.; CHATDARONG, K. Collagen and Glycosaminoglycan Profiles in the Canine Cervix during Different Stages of the Estrous Cycle and in Open and Closed-Cervix Pyometra. **Journal of Veterinary Medical Science.** v.76, n.2, p.197–203, 2014.

LINHARATTANARUKSA, P.; SWANGCHAN, T. U.; SRISUWATANASAGUL, S.; KHALID, M.; CHATDARONG, K. mRNA and Protein Expressions of Prostaglandin E2 Receptors (EP2 and EP4), Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E Synthase in the Cervix of Cyclic Bitches and those with Pyometra. **Thai Journal of Veterinary Medicine.** v.43, n.2, p.219-27, 2013.

LUA, J.V.; WEISTA, B.M.; RAAMB, B.J.; MARROA, B.S.; NGUYENA, L.V.; SRINIVASA, P.; BELLA, B.D.; LUHRSA, K.A.; LANEA, T.E.; SALVESEN, G.S.; WALSHA, C.M. Complementary roles of Fas-associated death domain (FADD) and receptor interacting protein kinase-3 (RIPK3) in T-cell homeostasis and antiviral immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v.108, n.37, p.15312-17, 2011.

MACEDO, R.M.; ÁVILA, I.; GONÇALVES, M.M. Estudo Comparativo entre Misoprostol e Placebo para o Amadurecimento Cervical e Indução do Parto. **Revista brasileira de ginecologia e obstetrician.** v.20, n.8, p.457-62, 1998.

MARTIN, I. **Avaliação imunoistoquímica dos receptores de progesterona (isoformas A e B), estrógenos α e β , hormônio luteinizante e das enzimas aromatase citocromo P450 e caspase-3 no corpo lúteo de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) durante o ciclo estral.** Botucatu, 2009. Tese (doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

MARTIN, I.; TORRES NETO, R.; OBA, E.; BURATINI JR, J.; BINELLI, M.; LAUFER-AMORIN, R.; FERREIRA, J.C.P. Immunohistochemical Detection of Receptors for Oestrogen and Progesterone in Endometrial Glands and Stroma during the Oestrous Cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) Cows. **Reproduction Domestic Animal**. v.43, n.2, p.415-21, 2008.

MARX, S.G.; WENTZ, M.J.; MACKAY, L.B.; SCHLEMBACH, D.; MAUL, H.; FITTKOW, C.; GIVEN, R.; VEDERNIKOV, Y.; SAADE, G.R.; GARFIELD, R.E. Effects of Progesterone on iNOS, COX-2, and Collagen Expression in the Cervix. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v.54, n.6, p.623-39, 2006.

MEHTA, J.L.; LOPEZ, L.M.; CHEN, L.; COX, O.E. Alterations in nitric oxide synthase activity, superoxide anion generation, and platelet aggregation in systemic hypertension, and effects of celiprolol. **American Journal of Cardiology**. v.74, p.901–5, 1994.

METCALFE, S.; VISCHER, C. Medical treatment of pyometra and the use of aglepristone. **Australian of Veterinary Practice**. v.36, p.171–4, 2006.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **Biology and Chemistry**. v.5, n.1, p.62–71, 2001.

MOTTA, A.B.; ESTEVEZ, A.; TOGNETTI, T.; GIMENO, M.A.; FRANCHI, A.M. Dual effects of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum. **Molecular Human Reproduction**. v.7, p.43–7, 2001.

NATUZZI, E.S.; URSELL, P.C.; HARRISON, M. Nitric oxide synthase activity in pregnant uterus decreases at parturition. **Biochemical Biophysical Research Communications**. v.15, p.1–8, 1993.

NOVARO, V.; COLMAN-LERNER, A.; ORTEGA, F.V.; JAWERBAUM, A.; PAZ, D.; CANDELARIO-JALIL, E.; CABALLERO, F.J.; CALZADO, M.A.; MUÑOZ, E. Regulation of metalloproteinases by nitric oxide in human trophoblast cells in culture. **Jornal of Reproduction and Fertility**. v.13, p.411–20, 2001.

NUNES F.; RODRIGUES R.; MEIRINHO M. Randomized comparison between intravaginal misoprostol and dinoprostone for cervical ripening and induction of labor. **American Journal of the Obstetric and Gynecology**. v.181, n.3, p.626-9, 1999.

OLIVEIRA, K.S. Cystic endometrial hyperplasia complex. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.35, n.2, p.270-2, 2007.

OLIVEIRA, P.C.; LOPES, M.D.; THOMÉ, H.E.; BALIEIRO, J.C.C. Avaliação citológica, histológica e hormonal de cadelas normais e com complexo hiperplasia endometrial cística/piometra. **Veterinária e Zootecnia**. v.15, n.1, p.150-9, 2008.

O'REILLY, L.; TAI, L.; LEE, L.; KRUSE, E.A.; GRABOW, S.; FAIRLIE, W.D.; HAYNES, N.M.; TARLINTON, D.M.; ZHANG, J.G.; BELZ, G.T.; SMYTH, M.J.; BOUILLET, P.; ROBB, L.; STRASSER, A. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. **Nature**. v.461, p.659–63, 2009.

PLATZ-CHRISTENSEN, J.J.; PERNEVI, P.; BOKSTROM, H.; WIQVIST, N. Prostaglandin E and F2 alpha concentration in the cervical mucus and mechanism of cervical ripening. **Prostaglandins**. n.53, p.253–61, 1997.

PEĆINA-SLAUS, N. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a Review. **Cancer Cell International**. v.10, n.22, p.1-5, 2010.

PRETZER, S.D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. **Theriogenology**. v.70, p.359-63, 2008.

POULOS, T.L.; LI, H. Structural Basis for Isoform-Selective Inhibition in Nitric Oxide Synthase. **Accounts of chemical research**. v.46, n.2, p.390-8, 2013.

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

REESE, J.; PARIA, B.C.; BROWN, N.; ZHAO, X.; MORROW, J.D.; DEY, S.K. Coordinated regulation of fetal and maternal prostaglandins directs successful birth and postnatal adaptation in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.97, p.9759-64, 2000.

ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; WATHES, D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptor in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**. v.122, p.965-79, 2001.

ROS, L.; STRÖM HOLST, B.; HAGMAN, R. A retrospective study of bitches with pyometra, medically treated with aglepristone. **Theriogenology**, v.82, n.9, p.1281-6, 2014.

ROSSELLI, M.; KELLER, P.J.; DUBEY, R.K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Human Reproduction Update**. v.4, n.1 p.3–24, 1998.

RUBIO, A.; BOYEN, F.; TAS, O.; KITSHOFF, A.; POLIS, I.; GOETHEM, B.V.; ROOSTER, H. Bacterial colonization of the ovarian bursa in dogs with clinically suspected pyometra and in controls. **Theriogenology**. v.82, p.966–71, 2014.

SALES, K.J.; JABBOUR, H.N. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. **Reproduction**. v.126, p.559–67, 2003.

SANDHOLM, M.; VASENIUS, H.; KIVISTO, A.K. Pathogenesis of canine pyometra. **Journal American Veterinary Medical Association**. v.167, n.11, p.1006-10, 1975.

SELAM, B.U.A.; KAYISLI, N.; ARICI, M.A. Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. **Biology Reproduction**. v.65 p.979, 2001.

SHARIF, H.; HAGMAN, R.; WANG, L.; ERIKSSON, S. Elevation of serum thymidine kinase 1 in a bacterial infection: Canine pyometra. **Theriogenology**. v.7, p.917–23, 2013.

SHARMA, K.; WANG, R.X.; ZHANG, L.Y.; YIN, D.L.; LUO, X.Y.; SOLOMON, J.C.; JIANG, R.F.; MARKOS, K.; DAVIDSON, W.; SCOTT, D.W. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. **Pharmacology & Therapeutics**. v.88, p.333–47, 2000.

SHEMESH, M.; DOMMBROVSKI, L.; GUREVICH, M.; SHORE, L.S.; FUCHS, A.R.; FIELDS, M.J. Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. **Reproduction and Fertility**. v.9, p.525–30, 1997.

SIEGEL, R.M.; FREDERIKSEN, J.K.; ZACHARIAS, D.A.; CHAN, F.K.; JOHNSON, M.; LYNCH, D. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. **Science**. v.288, p.2354–57, 2000.

SILVA, E.; LEITÃO, S.; FERREIRA-DIAS, G.; LOPES DA COSTA, L.; MATEUS, L. Prostaglandin synthesis genes are differentially transcribed in normal and pyometra endometria of bitches. **Reproduction in Domestic Animals**. v.44, n.2, p.200-3, 2010.

SIMMONS, D.L.; BOTTING, R.M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**. v.6, p.387–437, 2004.

SINGH, N.P.; SINGH, U.P.; NAGARKATTI, P.S.; NAGARKATTI, M. Prenatal Exposure of Mice to Diethylstilbestrol Disrupts T-Cell Differentiation by Regulating Fas/Fas Ligand Expression through Estrogen Receptor Element and Nuclear Factor-B Motifs. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**. v.343, n.2, p.351–61, 2012.

SLADEK, S.M.; REGENSTEIN, A.C.; LYKINS, D.; ROBERTS, J.M. Nitric oxide synthase in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy. **American Journal of the Obstetric and Gynecology**. v.169, p.1285–91, 1993.

SMITH, F.O. Canine pyometra. **Theriogenology**. v.66, p.610–2, 2006.

SORDELLI, M.S.; BELTRAME, L.S.; CELLA, M.; FRANCHI, A.M.; RIBEIRO, M.L. Cyclooxygenase-2 prostaglandins mediate anandamide-inhibitory action on nitric oxide synthase activity in the receptive rat uterus. **European Journal of Pharmacology**. v.685, p.174–9, 2012.

STAMLER, J.S.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. **Science**. v.258, p.1898–902, 1992.

STEPHANOU, A.; SCARABELLI, T.M.; BRAR, B.K.; NAKANISHI, Y.; MATSUMURA, M.; KNIGHT, R.A.; LATCHMAN, D.S. Induction of Apoptosis and Fas Receptor/Fas Ligand Expression by Ischemia/Reperfusion in Cardiac Myocytes Requires Serine 727 of the STAT-1 Transcription Factor but Not Tyrosine 701. **The journal of biological chemistry**. v.276, n.30, p.28340–47, 2001.

ST-LOUIS, I.; SINGH, M.; BRASSEUR, K.; LEBLANC, V.; PARENT, S.; ASSELIN, E. Expression of COX-1 and COX-2 in the endometrium of cyclic, pregnant and in a model of pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v.8, n.103, p.1-12, 2010.

STRASSER, A.; JOST, P.J.; NAGATA, S. The many roles of fas receptor signaling in the immune system. **Immunity**. v.30, p.180-92, 2009.

STRAUS, S.E.; SNELLER, M.; LENARDO, M.J.; PUCK, J.M.; STROBER, W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. **Annals of Internal Medicine Journal**. v.130, p.591–601, 1999.

TAMADA, H.; KAWATA, N.; KAWATE, N.; INABA, T.; KIDA, K.; HATOYA, S.; AKUNE, A.; NAKAMA, K.; KOHSAKA, T.; TAKAHASHI, M.; SAWADA, T. Factors associated with patency of the uterine cervix in bitches with piometra. **Theriogenology**, v.93, p.1203-10, 2012.

TELFER, J.; LYALL, F.; NORMAN, J.E.; CAMERON, I.T. Identification of nitric oxide synthase in human uterus. **Human Reproduction**. v.10, p.19–23, 1995.

TRAMBAS, C.M.; GRIFFITHS, G.M. Delivering the kiss of death. **Nature Immunology**. v.4, p.399–403, 2003.

VAN ISRAËL, N.; KIRBY, N.B.; MUNRO, A.C. Septic peritonitis secondary to unilateral pyometra and ovarian bursal abscessation in a dog. **Journal of Small Animal Practice**. v.43, p.452-5, 2002.

VERVERIDISA, H.N.; BOSCOA, C.M.; STEFANAKISB, A.; SARATSISA, P.; STAMOUA, A.I.; KRAMBOVITISB, E. Serum estradiol-17b, progesterone and respective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous piometra. **Theriogenology**. v.62, p.614-33, 2004.

VOLPATO, R. **Análise clínica e imunoistoquímica do útero e cérvix de cadelas com o diagnóstico de piometra**. Botucatu, 2011. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

VOLPATO, R.; REIS, M.V.; RODRIGUES, M.M.P.; TSUNEMI, R.H.; LOPES, M.D. Infiltrado leucocitário em cervix de cadelas com piometra aberta e fechada. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. v.37, n.2, p.171, 2013.

VOLPATO, R.; MARTIM, I.; RAMOS, R.S.; TSUNEMI, R.H.; LAUFER-AMORIM, R.; LOPES, M.D. Imunoistoquímica de útero e cervice de cadelas com diagnóstico de piometra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.64, n.5, p.1109-17, 2012.

WEISS, R.R.; CALOMENO, M.A.; SOUSA, R.S.; BRIERSDORF, S.M.; MURADÁS, P. Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela. **Archives of Veterinary Science**. v.9, n.2, p.81-7, 2004.

WILSON, N. S.; DIXIT, V.; ASHKENAZI, A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. **Nature Immunology**. v.10, p.348–55, 2009.

YU, S.Y.; TOZZI, C.A.; BABIARZ, J.; LEPPERT, P.C. Collagen changes in rat cervix in pregnancy—polarized light microscopic and electron microscopic studies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v.209, p.360–8, 1995.

ZHANG, Q.; COLLINS, V.; CHAKRABARTY, K.; ROSE, J.C.; WU, W.X. Regulation of the prostaglandin enzymatic system by estradiol and progesterone in nonpregnant sheep cervix. **Reproduction**. v.133, p.1027–34, 2007.

ZIDAR, N.; ODAR, K.; GLAVAC, D.; JERSE, M.; ZUPANC, T.; STAJER, D. Cyclooxygenase in normal human tissues – is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v.13, n.9, p. 3753-63, 2009.

Trabalho científico

9. TRABALHO CIENTÍFICO 1

O artigo científico será encaminhado a Theriogenology.

Theriogenology é uma revista internacional de reprodução animal com conceito qualis A2 no ano de 2014. As normais para a submissão do manuscrito estão descritas em : <http://www.theriojournal.com/content/authorinfo>

Avaliação imunoistoquímica da cérvix de cadelas saudáveis e com diagnóstico de piometra

R. Volpato^{*a}, M.H. Tsunemi^b, R. Laufer-Amorin^a, M.D Lopes^a

a - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP-Botucatu)

b - Instituto de Biociência (UNESP-Botucatu)

*Al. Jacarandás, 45. Cond. Portal de Itu. CEP: 13301-612 Itu-SP-Brasil
+55(11) 96739219 email: rodrigo.volpato@hotmail.com

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar os mecanismos envolvidos na abertura cervical em cadelas com piometra e em cadelas saudáveis. Para tanto, foram realizadas avaliações imunoistoquímicas em diferentes regiões da cérvix: epitélio luminal, região glandular e região muscular, para os receptores e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2. Foram utilizadas 11 cadelas com piometra aberta, 11 com piometra fechada, 6 saudáveis em fase folicular e 6 em fase luteal do ciclo estral. Todas as fêmeas foram submetidas a ovariectomia e dosagens de progesterona para confirmação da fase do ciclo estral. Para avaliar a imunomarcagem foram utilizados dois métodos. No primeiro, em cada um desses tecidos foram avaliados cinco campos, cada campo recebeu um escore de 0 a 4 (sendo 0 = 0 a 5%, 1 = 5 a 25%, 2 = 25 a 50%, 3 = 50 a 75% e 4 = 75 a 100% do campo positivo) sendo considerados positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. No segundo método a intensidade das marcações foi avaliada de forma subjetiva em fraca, moderada e forte, recebendo respectivamente escore 1, 2 e 3 para a análise estatística. As leituras foram realizadas em cinco campos

aleatórios, sendo todos os campos homogêneos. As avaliações foram realizadas em um microscópio de luz no aumento 400 vezes. Foram realizados os testes estatísticos não-paramétrico de Mann-Whitney para comparar os grupos piometra fechada e aberta. Entre os grupos piometra, fase luteal e fase folicular, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis. Os receptores i-NOS e FAS comportam-se da mesma maneira em cadelas com piometra aberta e fechada, não estando envolvidos no mecanismo de abertura cervical nessa doença. Os receptores e-NOS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2 foram encontrados em maior quantidade no grupo piometra aberta, sugerindo o envolvimento no mecanismo de abertura cervical. Os receptores i-NOS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2 não se mostraram diferentes nos grupos piometra, cadelas saudáveis em fase folicular e em fase luteal, sugerindo sua independência hormonal nas cadelas. O receptor e-NOS foi superior nas cadelas com piometra quando comparados aos grupos de cadelas saudáveis em fase folicular e em fase luteal, podendo estar correlacionado a presença de infiltrado inflamatório. O receptor FAS foi inferior no grupo de cadelas saudáveis em fase folicular quando comparado as cadelas com piometra e cadelas saudáveis em fase luteal, podendo estar relacionado a concentração de progesterona e ser ciclo dependente. Os resultados obtidos mostram a importância do assunto e a dificuldade de se demonstrar com clareza o mecanismo de controle da abertura cervical em cadelas.

Palavras-chave: cadela, piometra, imunoistoquímica

1. INTRODUÇÃO

No Brasil existe uma grande população de cadelas com risco de desenvolver um quadro de piometra, pois apenas uma pequena porcentagem de cadelas sadias é normalmente submetida à ovariosalpingohisterectomia eletiva. A situação é diferente em outros países mais desenvolvidos onde a prática da castração é comum e realizada em mais de 85% das cadelas [1].

A patogênese da piometra canina não é completamente esclarecida, a despeito de décadas de estudo sobre a etiologia desta doença. O conceito de Síndrome Hiperplasia Endometrial Cística/Piometra introduzido por Dow [2,3], sugere que mudanças hormonais são responsáveis por um quadro de

hiperplasia endometrial cística (HEC) que tornam o útero mais susceptível a infecção bacteriana secundária.

Atualmente é reconhecido que o desequilíbrio hormonal primário ou uma resposta anormal as concentrações normais de estrôgenos e progesterona afetam as células do epitélio do útero e facilitam a adesão, colonização e crescimento de bactérias [4].

A piometra pode se apresentar de forma aberta ou fechada, caracterizada pela presença ou ausência de secreção vaginal, respectivamente. Os sinais clínicos variam conforme o tempo de evolução e o grau de relaxamento da cérvix. Cadelas com piometra aberta, geralmente, apresentam um menor comprometimento do seu estado geral [5].

A taxa de sucesso global de tratamento médico para piometra relatada nos estudos varia de 83% a 100%. O sucesso maior é sempre em cadelas com cérvix aberta em comparação com as fechadas [6,7,8]. O entendimento do mecanismo de abertura e fechamento cervical sem duvida auxiliaria em melhores resultados nos tratamentos medicamentosos.

Algumas cadelas com piometra aberta podem apresentar um fechamento da cérvix durante o curso da doença, assim como cadelas com piometra fechada podem apresentar abertura cervical. Esse mecanismo de abertura e fechamento cervical pode ser devido a interações hormonais, ou pode ser apenas um fator mecânico pela pressão exercida pelo próprio acúmulo de secreção no interior do útero. De qualquer forma, o mecanismo de relaxamento cervical necessita de maiores estudos [9].

A importância da função cervical em gestações e algumas doenças levou diversos pesquisadores a estudarem a bioquímica e os mecanismos celulares da remodelação cervical. Estes estudos identificaram uma série de fatores endócrinos e parácrinos que potencialmente podem regular os processos de amadurecimento e dilatação cervical [10,11].

Este trabalho visa investigar os mecanismos de abertura e fechamento cervical, estudando a expressão de elementos considerados chave em um modelo tecnicamente possível para o entendimento funcional da abertura e fechamento cervical em cadelas saudáveis e com piometra. Para isso, analisaremos de forma comparativa os grupos piometra aberta e piometra fechada e cadelas saudáveis na fase folicular e luteal do ciclo estral, quanto à

ocorrência, concentração e localização dos receptores de e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α e COX-2 nas diferentes regiões da cérvix.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ABERTURA CERVICAL

A cérvix tem um papel crucial no ciclo reprodutivo e sua consistência varia de acordo com as fases do ciclo estral. Durante o estro a cérvix se dilata e se fecha durante as fases de anestro e diestro. Na cadela, alterações no relaxamento cervical são observadas não apenas durante o ciclo estral, mas também em algumas doenças como a piometra, que pode ser classificada em piometra de cérvix aberta ou piometra de cérvix fechada [12].

A cérvix é composta principalmente de tecido conjuntivo e músculo liso, suportado por uma matriz extracelular. A matriz extracelular é uma rede composta por feixes de colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, sendo o colágeno o mais abundante e responsável por fornecer suporte estrutural ao órgão [12].

As propriedades mecânicas da cérvix são derivadas da concentração de colágeno uma vez que o músculo liso constitui apenas 15% da massa do órgão. Feixes de colágenos proporcionam uma rigidez que pode ser alterada rapidamente por ação das colagenases. A fonte de colagenase e seu controle são temas atuais de pesquisas e debates [13].

Um mecanismo proposto para a abertura cervical é que o relaxamento durante o estro está associado com os esteróides ovarianos e hormônios gonadotróficos e causado principalmente por um rearranjo de fibras musculares lisas e tecido conjuntivo cervical [11,14,15].

Outro mecanismo de relaxamento cervical foi proposto por FALCHI e SCARAMUZZI [11], esse modelo propõe que o FSH, LH e o estradiol hajam na cérvix regulando a expressão dos seus próprios receptores e os da ocitocina. Quando a ocitocina se liga ao seu receptor, ativa uma proteína G que desencadeia uma série de vias que conduzem ao aumento intracelular de cálcio (Ca²⁺). O aumento intracelular Ca²⁺ é necessário para ativar a enzima fosfolipase A₂ que, quando fosforilada, mobiliza ácido araquidônico (AA) a partir de fosfolípidios de membrana. O AA na sua forma livre, atua como um substrato para COX-2, que catalisa a conversão em PGH₂.

Sugere-se que as prostaglandinas causem o relaxamento do músculo liso, o amolecimento e da dispersão da matriz extracelular da cérvix, resultando em dilatação cervical [11].

2.2. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (ON) é uma molécula não polar que livremente difunde-se através das membranas [22,23]. É responsável por muitas funções nos mamíferos e parece ser um importante regulador parácrino de vários processos reprodutivos femininos, como a secreção de gonadotrofinas, ovulação, regressão do corpo lúteo, implantação e desenvolvimento embrionário, contratilidade uterina, amadurecimento cervical e parto [23,24,25].

O ON é um potente vasodilatador e um mediador da permeabilidade vascular, além disso, aumenta a expressão de algumas metaloproteinases específicas que participam da remodelação de tecidos [26,27].

Estudos tem incidido sobre o óxido nítrico sintetase/óxido nítrico (NOS/ON), esse sistema tem sido postulado como tendo um papel regulador no miométrio e colo do útero durante a gestação e o parto. No colo do útero humano, o amadurecimento está associado com um aumento de ON na cérvix levando ao aumento na atividade de metaloproteinase, apoptose celular e síntese de glicosaminoglicano. Todas estas modificações estão associadas com o processo de amadurecimento cervical (24,29,30).

A presença e migração de células inflamatórias podem causar o aumento das atividades do NOS. Esses mecanismos parecem estar envolvidos no amadurecimento cervical devido ao processo de remodelação do tecido inflamatório e quebra de pontes químicas entre as fibras de colágeno [30].

Aplicações locais de ON em animais e seres humanos produzem características associadas ao processo de amadurecimento cervical [31]. Sob condições anormais, a progesterona prolonga a gestação e parece causar um aumento da expressão de i-NOS, o que sujere seu envolvimento na cascata de amadurecimento cervical [20].

2.3. FAS/FAS-L

O sistema FAS/FAS-L é o responsável por regular a apoptose, existindo diversos mecanismos de forma fisiológica e outros patológicos. O receptor FAS

é responsável pela morte celular a partir do fator de necrose tumoral e seu ligante, FAS-L, induz trimerização e recrutamento de domínio de morte [32].

A regulação da apoptose envolve um conjunto complexo de eventos por meio de interação de vários genes com efeitos estimulantes e inibitórios na morte celular programada. FAS (também chamado CD95 ou APO-1) é uma proteína de membrana do tipo I, membro do subgrupo da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral que contém um domínio de morte intracelular, pode iniciar a sinalização da apoptose e tem um papel crítico na regulação do sistema imunológico [33,34,35].

Apoptose induzida por FAS requer recrutamento e ativação da caspase iniciadora dentro do complexo de sinalização de indução a morte. Além de apoptose, FAS pode desencadear várias vias de sinalização não apoptóticas, assim como vias que promovem a ativação das células, proliferação celular e indução de resposta inflamatória [34,36,37].

2.4. PROSTAGLANDINAS

As prostaglandinas (PGs) representam uma família de mediadores lipídicos, que também compreendem os leucotrienos e tromboxanos e consistem de quatro membros, nomeados D2 prostaglandina (PGD2), prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina F2 α (PGF2 α) e prostaciclina. As PGs são profundamente envolvidas nas funções reprodutivas tais como ovulação, fertilização, implantação e parto. Elas também desempenham papéis cruciais nas doenças endometriais e na manutenção da gestação [38,39,40,41].

Aplicações de PGs em animais e humanos produzem características locais associadas ao amadurecimento cervical. Esse processo sugere que as PGs desempenham um papel importante no amadurecimento do colo do útero e no parto [20]. As propriedades luteolíticas e uterotônicas da PGF2 α têm sido utilizadas para tratar a piometra, principalmente a forma aberta, em cadelas jovens e com funções renais e hepáticas normais. A eficácia de PGF2 α é principalmente devido à sua capacidade de induzir a contração uterina [4].

No estro o grau de relaxamento do colo do útero, é provavelmente regulada pela síntese de PGs e remodelação da matriz extracelular. A prostaglandina atua estimulando o relaxamento do músculo liso e a síntese de

glicosaminoglicanos. A síntese de ácido hialurônico pode causar a remodelação de matriz extracelular do colo do útero culminando com o relaxamento cervical [42].

Desde o final da década de 1970, aplicação local na vagina ou colo uterino em mulheres e a administração sistêmica de PGs e análogos sintéticos têm sido consistentemente capaz de induzir o amadurecimento do colo [43] A eficiência clínica é um forte indício de que as PGs podem ter um papel na fisiologia da remodelação da cérvix.

A deposição de PGE2 na vagina ou cérvix da mulher, ovelha, égua e vaca origina um relaxamento e dilatação cervical *in vivo*, independentemente do estado fisiológico e das concentrações de progesterona. Na mulher, a aplicação de PGs na cérvix antes do parto induz a dilatação cervical [44,45].

É sabido que as PGs estão envolvidas no amadurecimento cervical fisiológico, sendo os fibroblastos iniciadores do processo controlando a permeabilidade e dilatação dos pequenos vasos sanguíneos. As PGs podem apresentar um efeito direto na estimulação da matriz metaloproteinase. O efeito vasoativo da PGE2 facilita a penetração de leucócitos na cérvix e os neutrófilos abundantes na circulação periférica são uma fonte importante de colagenase para o amadurecimento cervical final [14].

2.5. CICLO-OXIGENASE (COX)

A COX é uma enzima chave na síntese de prostanóides, é um potente mensageiro de lipídios bioativos com várias funções importantes. Foi descoberta na década de 1990 e existe em duas isoformas, a COX-1 e COX-2. A COX-1 é referida como um 'isoforma constitutiva', e é expressa na maioria dos tecidos em condições basais, em contraste, COX-2 é conhecido como um 'isoforma induzível', indetectável na maioria dos tecidos normais, mas sua expressão aumenta durante várias condições patológicas [46,47].

A COX- 2 são localizadas na porção muscular, no músculo liso vascular e no epitélio da cérvix e aumentam acentuadamente durante o trabalho ou apenas antes do parto. A indometacina, um inibidor inespecífico da COX, evita abortos espontâneos ou trabalho de parto prematuro em mulheres, pois inibe o relaxamento cervical [20,48] mostrando assim o envolvimento da COX no mecanismo de abertura e fechamento cervical.

A enzima COX-2 está envolvida com o aumento local de PGE₂; esse aumento conduz a diversas alterações associadas ao amadurecimento cervical, como a dilatação dos pequenos vasos, aumento da degradação do colágeno, aumento do ácido hialurônico, aumento da quimiotaxia dos leucócitos e aumento do estímulo e liberação da interleucina-8 (IL-8) [20,30].

O relaxamento cervical é provavelmente mediado por mudanças nos hormônios periovulatórios, síntese de PGs e remodelação da matriz extracelular do colo do útero. Há um aumento na expressão de COX-2 na cérvix de ovelhas no cio que pode estar associada com a remodelação do colágeno [15].

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa em questão atendeu aos requisitos impostos pela Comissão de Ética no uso de animais de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus Botucatu, recebendo o protocolo número 217/2011– CEEA.

Foram utilizadas 34 cadelas, sendo 22 com diagnóstico de piometra e 12 cadelas consideradas normais, seis encontravam-se na fase luteal do ciclo estral e seis na fase folicular. Do total de cadelas com piometra, 11(50%), apresentavam secreção vaginal purulenta, mucopurulenta ou sanguinolenta e 11(50%), foram diagnosticadas como piometra de cérvix de fechada.

Após o procedimento da OSH foram coletados fragmentos da cérvix para a avaliação imunistoquímica dos receptores de e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF₂ α -R e COX-2 de todas as cadelas.

3.1. ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Os fragmentos cervicais foram fixados em formol tamponado 10% durante 24 horas e, posteriormente, mantidos em álcool 70% até o momento de inclusão em parafina, realizada no Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu. Após a inclusão, cortes de três μ m foram obtidos, montados em lâminas com extremidade fosca e corados inicialmente em HE para avaliar a qualidade do material. Posteriormente novos cortes de três μ m

foram realizados e colocados em lâminas com extremidade fosca, previamente tratadas com Poly-L-lysina (Poly-L-lisine[®] – Sigma Chemical Co.- USA).

Para a desparafinização do material emblocado, as lâminas foram mantidas em estufa a 55°C por 24 horas e, posteriormente, colocadas em cuba de vidro com xilol à temperatura ambiente por 30 minutos e, a seguir mantidas em uma nova solução de xilol por 20 minutos. As lâminas foram transferidas para cubas de vidro para a hidratação em banhos de álcool, permanecendo por três minutos em cada cuba (álcool absoluto I, II, III, álcool 95% e 85%). Posteriormente as lâminas foram submetidas a dez passagens de água destilada. A partir desta etapa o tratamento se difere para cada antígeno pesquisado.

Receptores e-NOS: para a detecção de receptores de e-NOS realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em microondas, potência máxima - 750W, durante 10 minutos (2 ciclos de cinco minutos cada). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas com protein block (Dako, SERUM FREE Ready TO-USE, USA) por 30 minutos em estufa a 27°C, o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:100 (anticorpo rabbit polyclonal antibody to eNOS, abcam[®] - USA. Cód ab5589. Lot. GR102591-1), em câmara úmida durante 2h à temperatura de 37°C.

Receptores i-NOS: para a detecção de receptores de i-NOS realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em microondas, potência máxima - 750W, durante 10 minutos (2 ciclos de cinco minutos cada). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas com protein block (Dako, SERUM FREE Ready TO-USE, USA) por 30 minutos em estufa a 27°C, o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60

minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:100 (anticorpo rabbit polyclonal antibody to iNOS, abcam[®] - USA. Cód ab3523. Lot. GR104194-1), em câmara úmida durante 2h à temperatura de 37°C.

Receptores FAS: para a detecção de receptores FAS realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em microondas, potência máxima - 750W, durante 10 minutos (2 ciclos de cinco minutos cada). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas com protein block (Dako, SERUM FREE Ready TO-USE, USA) por 30 minutos em estufa a 27°C, o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:500 (anticorpo rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology[®] - USA. Cód sc715. Lot. J2912), em câmara úmida durante 2h à temperatura de 37°C.

Receptores FAS-L: para a detecção de receptores FAS-L realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako-USA). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas com protein block (Dako, SERUM FREE Ready TO-USE, USA) por 30 minutos em estufa a 27°C, o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:500 (anticorpo rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology[®] - USA. Cód sc956. Lot. E1311), em câmara úmida durante 2h à temperatura de 37°C.

Receptores PGF2 α -R: para a detecção de receptores PGF2 α -R realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako-USA). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas com protein block (Dako, SERUM FREE Ready TO-USE, USA) por 30 minutos em estufa a 27°C, o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:200 (anticorpo rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology[®] - USA. Cód sc67029. Lot. D0108), em câmara úmida durante 2h à temperatura de 37°C.

Receptores COX-2: para a detecção de receptores COX-2 realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako-USA). A etapa seguinte foi o bloqueio de proteínas com protein block (Dako, SERUM FREE Ready TO-USE, USA) por 30 minutos em estufa a 27°C, o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:100 (anticorpo monoclonal mouse, anti Human, Dako[®] - USA. Clone CX-294. Ref:M3917 Lot. 10052367), em câmara úmida durante 2h à temperatura de 37°C.

As próximas etapas foram semelhantes para todos os antígenos.

Após as 2 horas de incubação com o anticorpo primário em câmara úmida a 37°C, o material foi então submetido a banhos de TRIS e, posteriormente, incubado com o anticorpo secundário Histofine[®] (Nichirei Biosciences Inc. - Japan) por 30 minutos, ainda em câmara úmida, segundo instruções do fabricante. Realizou-se 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 ao abrigo da luz e novamente lavagem com solução tampão TRIS - pH 7,4.

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer por 1 minuto, e a coloração interrompida com lavagem em água corrente por 10 minutos e cinco passagens em água destilada.

Procedeu-se, então, a desidratação do material com banhos de álcool, as lâminas permaneceram 3 minutos em cada cuba (álcool 85%, 95%, álcool absoluto I, II, III, xilol I e II) e foram montadas com lamínulas utilizando-se resina sintética - Permount (Fisher Scientific – cód. UN1294e).

Como controle negativo, em outro corte de cérvix foi empregado a substituição do anticorpo primário pela imunoglobulina da mesma espécie onde foi produzida o primário, ou seja, foi empregado imunoglobulina de camundongo quando se tratava de anticorpos monoclonais (N-Universal Negative Control Mouse – DakoCytomation – CA, USA. Cód N1698) e frações de imunoglobulinas séricas de coelho para o anticorpo policlonal (N-Universal Negative Control Rabbit – DakoCytomation – CA, USA. Cód N1699).

Depois de todas as lâminas confeccionadas e identificadas realizou-se a leitura. As regiões avaliadas na cérvix foram o epitélio luminal, epitélio glandular e o muscular.

Para avaliar a imunomarcação foram utilizados dois métodos. No primeiro, em cada um desses tecidos foram avaliados cinco campos, cada campo recebeu um escore de 0 a 4 (sendo 0 = 0 a 5%; 1 = 5 a 25%; 2 = 25 a 50%; 3 = 50 a 75% e 4 = 75 a 100% do campo positivo) sendo considerados positivos aqueles citoplasmas corados em marrom e negativos aqueles corados em azul. No segundo método a intensidade das marcações foi avaliada de forma subjetiva em fraca, moderada e forte, recebendo respectivamente escore 1, 2 e 3 para a análise estatística. As leituras foram realizadas em cinco campos aleatórios, sendo todos os campos homogêneos. As avaliações foram realizadas em um microscópio de luz no aumento 400 vezes.

3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Software utilizado para a realização da estatística foi o SPSS Statistics 17.0. Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparar a presença e a concentração de cada receptor e região entre os grupos piometra fechada e aberta. Os valores de p menores que 0,05 indicam uma diferença significativa da medida mediana entre os grupos.

Entre os grupos piometra, fase luteal e fase folicular, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis. O valor de p menor que 0,05 indica que pelo menos um dos grupos apresenta mediana diferente dos demais.

4. RESULTADOS

4.1. Receptores e-NOS

Foram avaliadas imunomarcações dos receptores de e-NOS na cérvix (Figura 01) de cadelas com piometra e em fases folicular e luteal do ciclo estral. Constatou diferença significativa, sendo a maior concentração (intensidade) observada na região glandular do grupo piometra fechada em relação ao grupo piometra aberta. Quando a análise foi realizada entre os grupos piometra, fase folicular e fase luteal, também houve diferença, sendo a menor concentração (intensidade) evidenciada no grupo piometra em relação aos grupos fase folicular e fase luteal.

4.2. Receptores i-NOS

Foram avaliadas imunomarcações dos receptores de i-NOS na cérvix (Figura 2) de cadelas com piometra e em fases folicular e luteal do ciclo estral. Não foi constatada diferença significativa entre os grupos piometra aberta e fechada, assim como entre os grupos piometra, fase folicular e fase luteal.

4.3. Receptores FAS

Foram avaliadas imunomarcações para os receptores FAS na cérvix (Figura 3) de cadelas com piometra e em fases folicular e luteal do ciclo estral. Não foi constatada diferença significativa na imunomarcação dos receptores FAS entre os grupos piometra aberta e fechada. Entre os grupos piometra, fase folicular e fase luteal, foi constatada diferença significativa, sendo sua

concentração (intensidade) menor no grupo fase folicular quando comparado aos grupos piometra e fase luteal.

4.4. Receptores FAS-L

Foram avaliadas imunomarcações de receptores FAS-L na cérvix (Figura 4) de cadelas com piometra e em fases folicular e luteal do ciclo estral. Foi constatada diferença significativa, sendo o grupo piometra fechada o mais imunomarcado quando comparado ao grupo piometra aberta. Não foi constatada diferença significativa entre os grupos piometra, fase folicular e fase luteal.

4.5. Receptores PGF2 α -R

Foram avaliadas imunomarcações de receptores PGF2 α -R na cérvix (Figura 5) de cadelas com piometra e em fases folicular e luteal do ciclo estral. Foi constatada diferença significativa, sendo mais imunomarcadas a região glandular do grupo piometra fechada quando comparado a mesma região do grupo piometra aberta. A concentração (intensidade) dos receptores foi maior no grupo piometra fechada em relação ao grupo das abertas, assim como a concentração dos receptores na região glandular do grupo piometra fechada foi maior em relação a mesma região do grupo aberta. Não foi constatada diferença significativa entre os grupos piometra, fase folicular e fase luteal.

4.6. Receptores COX-2

Foram avaliadas imunomarcações de receptores COX-2 na cérvix (Figura 6) de cadelas com piometra e em fases folicular e luteal do ciclo estral. Foi constatada diferença significativa, sendo maior a concentração (intensidade) dos receptores na região glandular do grupo piometra fechada quando comparado a região do grupo piometra aberta. Não foi constatada diferença significativa entre o grupo piometra, fase folicular e fase luteal.

4.7. Resumo das comparações entre os grupos estudados

Os grupos estudados foram cadelas com o diagnóstico de piometra aberta e fechada, e cadelas saudáveis em fase folicular e fase luteal do ciclo estral. Foram estudados os receptores e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e

COX-2 em todos os grupos em diferentes regiões da cérvix (epitélio luminal, região glandular e muscular). Comparou-se os grupos piometra aberta x piometra fechada e o grupo piometra (piometra aberta + piometra fechada) x fase folicular x fase luteal quanto a presença dos receptores (Tabela 1) e quanto a concentração dos receptores (Tabela 2).

5. DISCUSSÃO

Esta pesquisa selecionou alguns fatores que podem estar envolvidos na abertura cervical em cadelas com piometra e em fase distintas do ciclo estral com a intenção de avançar na compreensão do relaxamento da cérvix. Neste experimento foram realizadas avaliações imunoistoquímicas da cérvix para a identificação e quantificação dos receptores e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2, em diferentes regiões da cérvix (epitelial, glandular e muscular) em cadelas saudáveis e com piometra.

As piometras abertas são menos tóxicas e mais fáceis de serem tratadas do que os casos de piometra fechada, mas os mecanismos envolvidos na abertura e fechamento da cérvix não são conhecidos. Se esses mecanismos fossem esclarecidos poderia-se no mínimo estimular a abertura cervical e induzir a eliminação do conteúdo uterino, elevando a taxa de sucesso dos tratamentos.

Estudos sobre a ocorrência e a localização de receptores hormonais em útero e cérvix de cadelas já foram apontados como possíveis causas de relaxamento cervical. Segundo Kunkitti et al. [10], os receptores de estrógeno e progesterona controlam a abertura e fechamento cervical durante o ciclo estral, infelizmente segundo esses autores o mecanismo envolvido, as mudanças e associações bioquímicas que ocorrem durante esse processo não são completamente elucidado. Volpato et al. [18], utilizando a técnica de imunoistoquímica, pesquisaram receptores de progesterona e estrógeno α e β no útero e cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada. O número de núcleos positivos para receptores de estrógeno e progesterona não diferiram entre as cadelas com piometra aberta e piometra fechada [10,18], entretanto, Volpato et al. [18] identificaram uma maior concentração de receptores de progesterona na cérvix de cadelas com piometra fechada. Esse resultado permitiu levantar a hipótese de que concentrações fisiológicas de progesterona

poderiam ser suficientes para causar alteração na patência da cérvix em virtude de uma maior concentração local de receptores para esse hormônio.

Posteriormente à revisão de literatura, um fluxograma foi proposto como hipótese da interferência de cada receptor estudado na cascata que leva ao relaxamento cervical (Figura 7). O ponto chave seria a quebra do colágeno recém sintetizado e a quebra das pontes químicas entre as fibras de colágeno.

A avaliação imunoistoquímica empregada neste trabalho foi capaz de marcar com diferença de intensidade os núcleos das células que possuíam os receptores avaliados. Por ser uma técnica semiquantitativa, a presença e a intensidade da marcação refletem, respectivamente, a positividade da célula e a concentração destes receptores. Os receptores pesquisados nesse estudo foram identificados em todos os grupos avaliados.

O útero sofre alterações estruturais importantes durante o ciclo estral e a gestação. As células que regulam a contratilidade do músculo liso e a contração e a distensão espontânea do útero, são dependentes da NOS [28].

Os dados relativos à regulação da síntese de ON durante a gestação e o parto sugerem que a NOS é o jogador-chave na regulação da função contrátil do útero. Tem sido mostrado que existe um aumento nas atividades NOS em útero de ratas durante a prenhez e uma diminuição no momento do parto [49]; resultado similar foi demonstrado em coelhos [50]. Essa situação fornece evidências de que ON desempenha um papel importante no mecanismo de abertura e fechamento do colo uterino durante a prenhez e o parto podendo inclusive estar envolvida na remodelação do tecido conjuntivo.

Por esse motivo investigamos o papel do ON nos mecanismos de abertura e fechamento cervical, através do mapeamento da expressão de e-NOS e i-NOS na cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada, e em fases folicular e lútea do ciclo estral. Até a presente data não existem muitas fontes na literatura acerca desse assunto na reprodução de carnívoros.

Os receptores e-NOS não apresentaram diferença entre os grupos piometra aberta e piometra fechada quanto a contagem total de células positivas. Da mesma maneira, não houve diferença significativa quando comparamos os grupos de cadelas saudáveis na fase folicular, na fase luteal e com diagnóstico de piometra. Em contra partida, foi observada uma intensidade maior de marcação na região glandular da cérvix para o receptor e-NOS no

grupo piometra fechada quando comparado ao grupo piometra aberta. A somatória das regiões e as regiões luminal e muscular não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos de piometra. Quando comparamos o grupo piometra com os grupos de cadelas em fase folicular e fase luteal, não foi observado diferença na positividade de marcação entre os grupos, porém os grupos folicular e luteal, tem maior intensidade quando comparados ao grupo piometra.

O maior nível de expressão de e-NOS no útero de vacas foi medida no final do ciclo estral [25]. No nosso estudo em cadelas, não houve diferença entre as fases do ciclo estral estudadas.

Nossa pesquisa conseguiu identificar os receptores i-NOS em todos os animais utilizados, porém não houve diferença estatística em nenhuma das análises comparativas.

O papel fisiológico de e-NOS e i-NOS no útero de mulheres foi estudado em profundidade por Buhimschi et al. [51], que demonstraram que tanto e-NOS quanto i-NOS são reguladas durante a gravidez causando relaxamento do miométrio. As constatações destes pesquisadores fornecem evidências convincentes de que o ON faz parte do controle da contratilidade uterina.

A relevância fisiológica e biológica de ON durante a gestação e o trabalho de parto vem da constatação de que a inibição da síntese de ON prolongou a duração do parto, o intervalo entre cada filhote nascido e diminuiu a extensibilidade cervical [28].

O resultado do nosso experimento foi exatamente o contrário do esperado, ou seja, esperávamos encontrar mais receptores para NOS no grupo piometra aberta, pois uma maior quantidade de NOS aumentaria a liberação de enzimas colagenolíticas (metaloproteinasas e proteases) quebrando assim as pontes químicas entre as fibras de colágenos, aumentando a proporção colágeno/musculatura lisa causando o relaxamento da cérvix. Nosso resultados discordam de Natuzzi et al. [49] e Sladek et al. [50] que encontraram mais receptores NOS no momento do parto de ratas e coelhas, respectivamente, onde a cérvix se encontra aberta. Não conseguimos comprovar que e-NOS e i-NOS tenham uma participação clara no mecanismo de relaxamento cervical em cadelas.

A maior parte dos dados provenientes desses estudos é realizada em ratos e seres humanos e um papel direto do ON no controle da reprodução em animais domésticos é especulativo. Nossa busca na literatura revelou que existe uma escassez de informação sobre a distribuição e localização de NOS.

O FAS, além da apoptose, pode desencadear várias vias de sinalização não apoptóticas, assim como vias que promovem a ativação das células e proliferação celular [34].

Ao avaliar a imunomarcagem e sua intensidade não foi constatada diferença estatística entre o grupo piometra aberta e fechada. Quando comparamos o grupo piometra com os grupos fase folicular e fase luteal, não houve diferença estatística quanto a positividade da marcação, mas ao avaliar a intensidade da coloração, o que esta diretamente relacionada a concentração dos receptores, a cérvix de cadelas em fase folicular apresentaram uma menor concentração de receptores que as cadelas com diagnóstico de piometra e em fase luteal na somatório das regiões avaliadas. Quando examinamos a região luminal, glandular e muscular separadamente, não houve diferença estatística entre os grupos piometra, fase folicular e fase luteal.

O sistema FAS/FASL desempenha um papel importante na regulação da homeostase fisiológica do sistema imunitário. Quando comparamos a imunorreatividade dos receptores FAS-L, o grupo piometra fechada foi maior quanto a positividade dos receptores quando comparada ao grupo piometra aberta. Ao dividir as regiões da cérvix em luminal, glandular e muscular não houve diferença estatística, assim como não houve diferença entre os grupos ao analisar a intensidade da marcação. Quando a comparação ocorreu entre o grupo piometra e os grupos de cadelas em fase folicular e luteal, não houve diferenças estatísticas.

A função de FAS-L é mediada pela metaloproteases, podendo ter atividades não apoptóticas, tais como a indução de resposta inflamatória [36,37]. Duas hipóteses foram levantadas ao estudarmos os receptores de FAS e FAS-L. A primeira é que encontraríamos mais receptores no grupo piometra fechada por serem mais tóxicas e com processos inflamatórios mais exacerbados. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto aos receptores FAS, mas FAS-L foi maior no grupo piometra fechada quando a análise foi realizada com a positividade somada de todas as camadas. Outra

hipótese era de encontrarmos mais receptores FAS e FAS-L no grupo piometra aberta pois sua principal ação, que é a apoptose, poderia consumir o colágeno recém sintetizado, alterando a relação colágeno/musculatura lisa fazendo o relaxamento cervical, o que não pode ser concluído.

Selam et al. [51] demonstraram que a regulação da expressão de FAS-L no endométrio humano é ciclo dependente. A expressão de FAS-L no estroma endometrial e nas células glandulares é regulada por estrógeno e progesterona. Pelos resultados do nosso experimento, essa hipótese não foi confirmada em cadelas.

Sugere-se que o mecanismo pelo qual as prostaglandinas induzem o relaxamento cervical é complexo e não envolve apenas o relaxamento muscular, mas também o envolvimento de componentes de matriz extracelular segregados por fibroblastos [42].

Há poucas informações disponíveis sobre a influência das PGs na composição celular do tecido cervical. Se as prostaglandinas endógenas desempenham um papel na fisiologia do amadurecimento e dilatação da cérvix, é de se esperar que os níveis de prostaglandinas devam estar altos no tecido cervical em situações de relaxamento cervical.

Em nosso estudo os resultados mais expressivos entre os grupos piometra aberta e fechada foram dos receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$. Estes receptores apresentaram-se em maior quantidade na região glandular do grupo piometra fechada em relação ao grupo aberta. Além disso, sua intensidade de marcação foi maior no grupo piometra fechada tanto na somatória das regiões da cérvix quanto na porção glandular. Quando comparamos o grupo piometra com os grupos fase folicular e fase luteal, não houve diferença estatística em nenhuma das análises realizadas.

O efeito da ocitocina em relaxamento cervical em vacas é mediada por um aumento local de COX-2 e um subsequente aumento da síntese de prostaglandinas [52]. Em nosso estudo não foi notado aumento nos receptores de prostaglandinas no grupo piometra de cérvix aberta; o grupo piometra fechada foi quem apresentou o maior número de receptores.

Esse resultado também não era esperado, um maior número de receptores de prostaglandina deveria ser encontrado nos animais com a cérvix relaxada. As PGs aumentam a quimiotaxia para leucócitos, causam dilatação

de pequenos vasos e aumentam a liberação de metaloproteinases e proteases, processos esses responsáveis pelo relaxamento cervical.

A proposta de que a prostaglandina interfere diretamente sobre a ação dos leucócitos foi estudada por Volpato et al. [53], neste trabalho, utilizando seis cadelas com piometra aberta e seis cadelas com piometra fechada, não foi encontrada diferença significativa entre o infiltrado leucocitário observado na cérvix de cadelas com piometra aberta ou fechada, tanto no total dos leucócitos como na quantificação de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos e plasmócitos. De acordo com os resultados a infiltração leucocitária não está associada a abertura cervical na piometra canina.

Ao analisar o muco do colo do útero de mulheres para PGE2 e PGF2 α durante o período de relaxamento cervical e em períodos normais, não foi encontrado diferença na concentração conforme era esperado [54]. Esses resultados corroboram com nosso trabalho, ao pesquisar receptores de PGF2 α em cadelas em diferentes fases do ciclo estral não encontramos diferenças significativas entre elas.

Foi levantada a hipótese de que a prostaglandina sintetizada nos tecidos adjacentes podem difundir-se para a cérvix afetando sua estrutura e função. Este parece ser um mecanismo importante pelo qual as prostaglandinas atuam durante a fase ativa do trabalho de parto, quando a cérvix progressivamente se abre, pois, é fato bem documentado o seu envolvimento no mecanismo de regulação da abertura cervical [43]. Essa hipótese explicaria nossos resultados de não encontrarmos um aumento dos receptores de prostaglandinas no tecido cervical nos casos de piometra aberta e fase folicular do ciclo estral.

Gogny et al. [55] forneceu a primeira evidencia *in vitro* da participação dos receptores de PGF2 α nas contrações uterinas, indicando a expressão funcional de tais receptores no miométrio do útero de cadelas. A PGF2 α induziu uma resposta contráctil mais forte nas fibras longitudinais do que nas fibras circulares do miométrio. No entanto, o mecanismo responsável pela diferença na resposta contráctil entre as duas camadas musculares ainda tem que ser determinada.

Apesar da visão generalizada de que prostaglandinas desempenham um papel-chave na promoção das contrações uterinas e o amadurecimento do colo do útero, o modo pelo qual agem ainda é pouco compreendido [43].

A distribuição de COX em tecidos é complexa, ambas as isoformas, COX-1 e COX-2, estão presentes em muitos tecidos normais e em várias condições patológicas [47]. O relaxamento cervical no estro é induzido por hormônios ovarianos e hipofisários estimulando a produção local de PGE2 por meio de uma via biossintética que envolve um número de mediadores incluindo COX-2 [11].

Ao avaliar as imunomarcações dos receptores COX-2 em nosso estudo, não houve diferença estatística quanto a positividade quando comparamos o grupo piometra aberta e fechada. Quando pesquisamos sobre a intensidade da marcação, notamos que na região glandular a marcação imunoistoquímica é mais intensa no grupo piometra fechada em relação ao grupo aberta, não havendo diferenças estatísticas quando comparamos os grupos nos estudos das regiões luminal e muscular e na somatória das três regiões. Ao comparar o grupo piometra aos grupos de cadelas na fase folicular e na fase luteal, não observamos diferenças estatísticas na positividade e nem na intensidade, em nenhuma das análises comparativas realizadas.

No estudo de Silva et al. [56] foram estudadas as enzimas COX-1 e COX-2 no útero de cadelas normais e com piometra. COX-1 foi significativamente maior em cadelas com piometra do que no endométrio normal, porém foi observada em ambos, normal e piometra. A enzima COX-2 só estava presente no útero de cadelas com piometra. Em nosso estudo foi evidenciada marcação imunoistoquímica de COX-2 em todas as cadelas com o diagnóstico de piometra e nas fases folicular e luteal do ciclo estral.

A expressão dos genes de COX-2 na cérvix de cadelas cíclicas e com piometra foi estudada por Linharattanaruksa et al. [57]. Nas fêmeas cíclicas normais durante todas as fases do ciclo estral, assim como nas cadelas com piometra, COX-2 foi expresso, no entanto, não foram observadas diferenças em suas expressões. Concluiu-se que a expressão de COX-2 na cérvix não sofre influência dos hormônios ovarianos. Esse trabalho corrobora com os nossos dados não havendo diferenças estatísticas entre os grupos de cadelas com o diagnóstico de piometra e nas fases folicular e luteal do ciclo estral.

St-Louis et al. [41] e Reese et al. [58] relataram um aumento da expressão de COX no útero de ratas no momento do parto. COX é uma fonte

importante de prostaglandinas durante o parto e é essencial para a abertura cervical. Nossa hipótese compartilha com esses resultados.

Atualmente muitos estudos estão sendo realizados com receptores no útero e cérvix de cadelas normais e com piometra, entretanto, ainda não foi possível elucidar por completo o mecanismo de abertura ou fechamento da cérvix nessa condição.

Novos estudos são necessários abordando ainda o mecanismo de abertura e fechamento cervical. Avaliações das proporções de colágeno e fibras musculares conforme o considerado por Chatdarong et al. [21], além da análise da direção dessas fibras, talvez seja uma opção para o estudo da abertura cervical, bem como o exame histológico comparativo da cérvix durante o trabalho de parto.

6. CONCLUSÃO

Levando em consideração os objetivos propostos podemos concluir que os receptores e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2 estão presentes em todos os grupos avaliados (piometra aberta, piometra fechada, cadelas saudáveis em fase folicular e em fase luteal), sendo localizados em todas as regiões da cérvix (luminal, glandular e muscular).

Os receptores i-NOS e FAS comportam-se da mesma maneira em cadelas com piometra aberta e fechada, não estando envolvidos no mecanismo de abertura cervical nessa doença.

Os receptores e-NOS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2 foram encontrados em maior quantidade no grupo piometra fechada quando comparados ao grupo piometra aberta, sugerindo o envolvimento no mecanismo de abertura/fechamento cervical.

Os receptores i-NOS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2 não se mostraram diferentes nos grupos piometra, cadelas saudáveis em fase folicular e em fase luteal, sugerindo sua independência hormonal nas cadelas.

O receptor e-NOS foi superior nas cadelas com piometra quando comparados aos grupos de cadelas saudáveis em fase folicular e em fase luteal, podendo estar correlacionado a presença de infiltrado inflamatório.

O receptor FAS foi inferior no grupo de cadelas saudáveis em fase folicular quando comparado as cadelas com piometra e cadelas saudáveis em

fase luteal, podendo estar relacionado a concentração de progesterona e ser ciclo dependente.

Os resultados obtidos mostram a importância do assunto e a dificuldade de se demonstrar com clareza as relações endócrinas, parácrinas e inflamatórias possivelmente envolvidas no mecanismo de relaxamento cervical.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Hagman R, Reezigt BJ, Ledin HB, Karlstam E. Blood lactate levels in 31 female dogs with pyometra. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2009;51(2):11-9.
- [2] Dow C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *The Veterinary Record* 1957;(69):1409-15.
- [3] Dow C. The cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *The Veterinary Record* 1958;(70):1102-8.
- [4] Fieni F, Topie E, Gogny A. Medical Treatment for Pyometra in Dogs. *Reproduction Domestic Animal* 2014;9(2):28–32.
- [5] Byers CG, Williams JE, Saylor DK. Pyometra with inguinal herniation of the left uterine horn and omentum in a Beagle dog. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2007;17(1):86–92.
- [6] Metcalfe S, Vischer C. Medical treatment of pyometra and the use of aglepristone. *Australian of Veterinary Practice* 2006;(36):171–4.
- [7] Jurka P, Max A, Hawrynsk K, Snochowsski M. Age-related pregnancy results and further examination of bitches after aglepristone treatment of pyometra. *Reproduction Domestic Animal* 2010;(45):525–9.
- [8] Ros L, Ström HB, Hagman R. A retrospective study of bitches with pyometra, medically treated with aglepristone. *Theriogenology* 2014;(82)9:1281-6
- [9] Tamada H, Kawata N, Kawate N, Inaba T, Kida K, Hatoya S, Akune A, Nakama K, Kohsaka T, Takahashi M, Sawada T. Factors associated with patency of the uterine cervix in bitches with piometra. *Theriogenology* 2012;(93):1203-10.
- [10] Kunkitti P, Srisuwatanasagul S, Chatdarong K. Distribution of estrogen receptor alpha and progesterone receptor, and leukocyte infiltration in the cervix of cyclic bitches and those with pyometra. *Theriogenology* 2011;(75):979-87.

- [11] Falchi L, Scaramuzzi RJ. The expression of ER α , OTR, cPLA 2, COX-2, and PPAR γ in the cervix of the ewe during the estrous cycle. *Theriogenology* 2013;(79):40–7.
- [12] Linharattanaruksa P, Srisuwatanasagul S, Ponglowhapan S, Khalid M, Chatdarong K. Collagen and Glycosaminoglycan Profiles in the Canine Cervix during Different Stages of the Estrous Cycle and in Open- and Closed-Cervix Pyometra. *Journal of Veterinary Medical Science* 2014;(76)2:197–203.
- [13] Kelly RW. Inflammatory mediators and cervical ripening. *Journal of Reproductive Immunology* 2002;(57):217–24.
- [14] Leethongdee S, Khalid M, Bhatti A, Ponglowhapan S, Kershaw CM, Scaramuzzi RJ. The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. *Theriogenology* 2007;(67):767–77.
- [15] Kershaw CM, Scaramuzzi RJ, McGowan MR, Wheeler-Jones CP, Khalid M. The expression of prostaglandin endoperoxide synthase 2 messenger RNA and the proportion of smooth muscle and collagen in the sheep cervix during the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 2007;(76):124–9.
- [16] Weiss RR, Calomeno MA, Sousa RS, Briersdorf SM, Muradás P. Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela. *Archives of Veterinary Science* 2004;(9)2:81-7.
- [17] Volpato R. Análise clínica e imunoistoquímica do útero e cérvix de cadelas com o diagnóstico de piometra. Botucatu, 2011. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- [18] Volpato R, Martim I, Ramos RS, Tsunemi RH, Laufer-Amorim R, Lopes MD. Imunoistoquímica de útero e cérvix de cadelas com diagnóstico de piometra. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2012;(64)5:1109-17.
- [19] Yu SY, Tozzi CA, Babiarz J, Leppert PC. Collagen changes in rat cervix in pregnancy—polarized light microscopic and electron microscopic studies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1995;(209):360–8.
- [20] Marx SG, Wentz MJ, Mackay LB, Schlembach D, Maul H, Fittkow C, Given R, Vedernikov Y, Saade GR, Garfield RE. Effects of Progesterone on iNOS,

COX-2, and Collagen Expression in the Cervix. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2006;(54)6:623-39.

[21] Chatdarong K, Linharattanakul P, Sirivaidyapong S, Srisuwatamasakul S. The proportions of Smooth Muscle and Collagen in the Cervical Tissue of Bitches during Various Stages of the Estrous Cycle and Bitches Developing. *Proceedings 9th Chulalongkorn University Veterinary Science the Animal Company* 2010(1):129.

[22] Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* 1992;(258):1898–902.

[23] Dixit VD, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal Reproduction Science* 2001;(65):1–16.

[24] Motta AB, Estevez A, Tognetti T, Gimeno MA, Franchi AM. Dual effects of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum. *Molecular Human Reproduction* 2001;(7):43–7.

[25] Lapointe J, Roy M, St-Pierre I, Kimmins S, Gauvreau D, Maclaren LA, Bilodeau JF. Hormonal and Spatial Regulation of Nitric Oxide Synthases (NOS) (Neuronal NOS, Inducible NOS, and Endothelial NOS) in the Oviducts. *Endocrinology* 2006;(147)12:5600–10.

[26] Novaro V, Colman-Lerner A, Ortega FV, Jawerbaum A, Paz D, Candelario-Jalil E, Caballero FJ, Calzado MA, Muñoz E. Regulation of metalloproteinases by nitric oxide in human trophoblast cells in culture. *Journal of Reproduction and Fertility* 2001;(13):411–20.

[27] Sordelli MS, Beltrame LS, Cella M, Franchi AM, Ribeiro ML. Cyclooxygenase-2 prostaglandins mediate anandamide-inhibitory action on nitric oxide synthase activity in the receptive rat uterus. *European Journal of Pharmacology* 2012;(685):174–9.

[28] Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update* 1998;(4)1:3–24.

[29] Poulos TL, Li H. Structural Basis for Isoform-Selective Inhibition in Nitric Oxide Synthase. *Accounts of chemical research* 2013;(46)2:390-8.

[30] Goldberg AE. Role of various hormones in the process of cervical ripening. Disponível em : <<http://emedicine.medscape.com/article/263311-overview#aw2aab6b5>> Acesso em: 12 de julho, 2014

- [31] Ledingham MA, Thomson AJ, Young A, Macara LM, Greer IA, Norman JE. Changes in the expression of nitric oxide synthase in the human uterine cervix during pregnancy and parturition. *Molecular Human Reproduction* 2000;(6):1041–8.
- [32] Lerma E, Romero M, Gallardo A, Pons C, Muñoz J, Fuentes J, Lloveras B, Catusus L, Prat J. Prognostic significance of the Fas receptor/Fas-ligand system in cervical squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2008;(452):65-74.
- [33] Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A. Human Chorionic Gonadotropin Contributes to Maternal Immunotolerance and Endometrial Apoptosis by Regulating Fas-Fas Ligand System. *The Journal of Immunology* 2003;(171):2305-13.
- [34] Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death and Differentiation* 2012;(19):42–50.
- [35] Hansford JR, Pal M, Poplawski N, Haan E, Boog B, Ferrante A, Davis J, Niemela JE, Rao VK, Suppiah R. In utero and early postnatal presentation of autoimmune lymphoproliferative syndrome in a family with a novel FAS mutation. *Haematologica* 2013;(98):38-9.
- [36] Trambas CM, Griffiths GM. Delivering the kiss of death. *Nature Immunology* 2003;(4):399–403.
- [37] Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature Immunology* 2009;(10):348–55.
- [38] Sales KJ, Jabbour HN. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. *Reproduction* 2003;(126):559–67.
- [39] Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction* 2006;(12):731–46.
- [40] Carli C, Metz CN, Al-Abed Y, Naccache PH, Akoum A. Up-Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Production in Human Endometriotic Cells by Macrophage Migration Inhibitory Factor: Involvement of Novel Kinase Signaling Pathways. *Endocrinology* 2009;(150):3128–37.
- [41] St-Louis I, Singh M, Brasseur K, Leblanc V, Parent S, Asselin E. Expression of COX-1 and COX-2 in the endometrium of cyclic, pregnant and in

a model of pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010;(8)103:1-12.

[42] Kershaw CM, Khalid M, MCGowan MR, Pitsillides AA, Scaramuzzi RJ. The mRNA expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and the changes in glycosaminoglycans in the sheep cervix during the estrous cycle. *Theriogenology* 2009;(72):251–61.

[43] Hertelendya F, Zakarb T. Prostaglandins and the myometrium and cervix. *Science director - Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2004;(70):207–22.

[44] Nunes F, Rodrigues R, Meirinho M. Randomized comparison between intravaginal misoprostol and dinoprostone for cervical ripening and induction of labor. *American Journal of the Obstetric and Gynecology* 1999;(181)3:626-9.

[45] Barbas JP, Gonçalves SC, Marques CC, Horta AEM. Efeito da aplicação vaginal de agentes dilatadores do cérvix durante a fase folicular do ciclo em ovelhas. *Proceedings do III Congresso Ibérico de Reprodução Animal* 2001:299-307.

[46] Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews* 2004;(6):387–437.

[47] Zidar N, Odar K, Glavac D, Jerse, M, Zupanc T, Stajer D. Cyclooxygenase in normal human tissues – is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009;(13)9:3753-63.

[48] Bukowski R, McKay L, Shi SQ, Saade GR, Garfield RE. The effects of cervical application of inhibitors of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-1, and cyclooxygenase-2 on delivery in rats. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2001;(185):959–65.

[49] Natuzzi ES, Ursell PC, Harrison M. Nitric oxide synthase activity in pregnant uterus decreases at parturition. *Biochemical Biophysical Research Communications* 1993;(15):1–8.

[50] Sladek SM, Regenstein AC, Lykins D, Roberts JM. Nitric oxide synthase in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy. *American Journal of the Obstetric and Gynecology* 1993;(169):1285–91.

- [51] Selam BUA, Kayisli N, Arici MA. Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biology of Reproduction* 2001;(65):979.
- [52] Shemesh M, Dommbrovski L, Gurevich M, Shore LS, Fuchs AR, Fields MJ. Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *Reproduction and Fertility* 1997;(9):525–30.
- [53] Volpato R, Reis MV, Rodrigues MMP, Tsunemi RH, Lopes MD. Infiltrado leucocitário em cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada. *Anais do XX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal* 2013;(37)2:171.
- [54] Platz-Christensen JJ, Pernevi P, Bokstrom H, Wiqvist N. Prostaglandin E and F2 alpha concentration in the cervical mucus and mechanism of cervical ripening. *Prostaglandins* 1997;(53)253–61.
- [55] Gognya A, Mallemb Y, Destrumellea S, Thorinb C, Desfontisb JC, Gognyb M, Fiénia F. In vitro comparison of myometrial contractility induced by aglepristone-oxytocin and aglepristone-PGF2alpha combinations at different stages of the estrus cycle in the bitch. *Theriogenology* 2010;(74)1531-8.
- [56] Silva E, Leitão S, Ferreira-Dias G, Lopes da Costa L, Mateus L. Prostaglandin synthesis genes are differentially transcribed in normal and pyometra endometria of bitches. *Reproduction in Domestic Animals* 2010;(44)2:200-3.
- [57] Linharattanakul P, Swangchan TU, Srisuwatanasagul S, Khalid M, Chatdarong K. mRNA and Protein Expressions of Prostaglandin E2 Receptors (EP2 and EP4), Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E Synthase in the Cervix of Cyclic Bitches and those with Pyometra. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 2013;(43)2:219-27.
- [58] Reese J, Paria BC, Brown N, Zhao X, Morrow JD, DEY SK. Coordinated regulation of fetal and maternal prostaglandins directs successful birth and postnatal adaptation in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000;(97):9759-64.

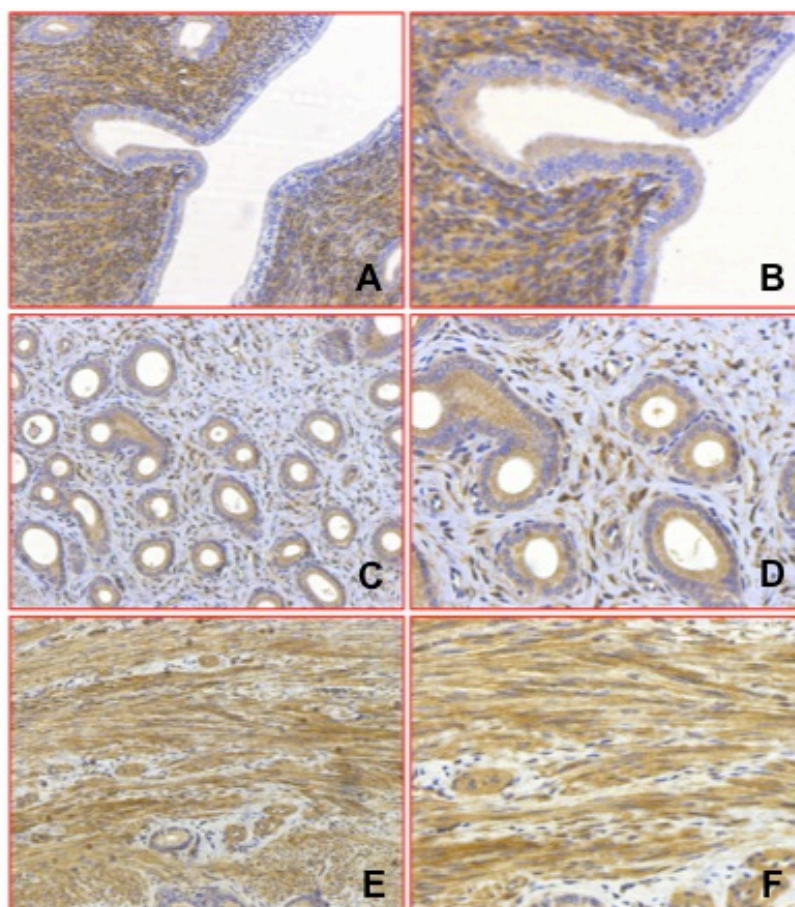


Figura 01: Detecção imunoistoquímica de receptores e-NOS, sendo considerados núcleos positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azuis. “A” receptores de e-NOS no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de e-NOS no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de e-NOS na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de e-NOS na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de e-NOS na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de e-NOS na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

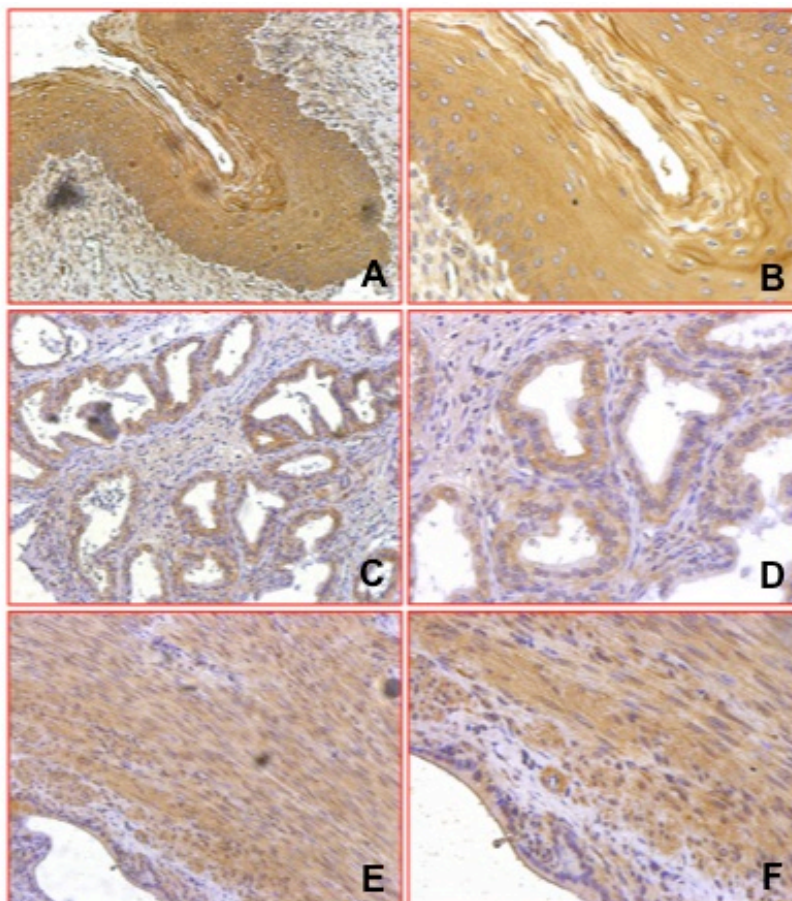


Figura 02: Detecção imunoistoquímica de receptores de i-NOS, sendo considerados núcleos positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azuis. “A” receptores de i-NOS no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de i-NOS no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de i-NOS na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de i-NOS na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de i-NOS na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de i-NOS na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

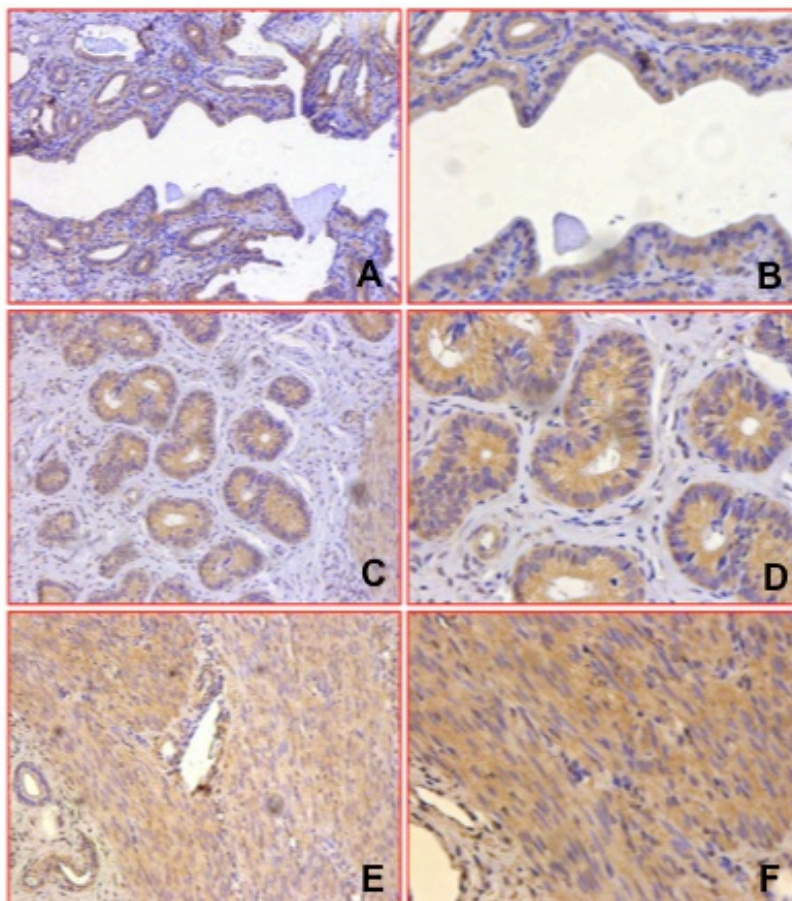


Figura 03: Detecção imunoistoquímica de receptores FAS, sendo considerados núcleos positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azuis. “A” receptores de FAS no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de FAS no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de FAS na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de FAS na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de FAS na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de FAS na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

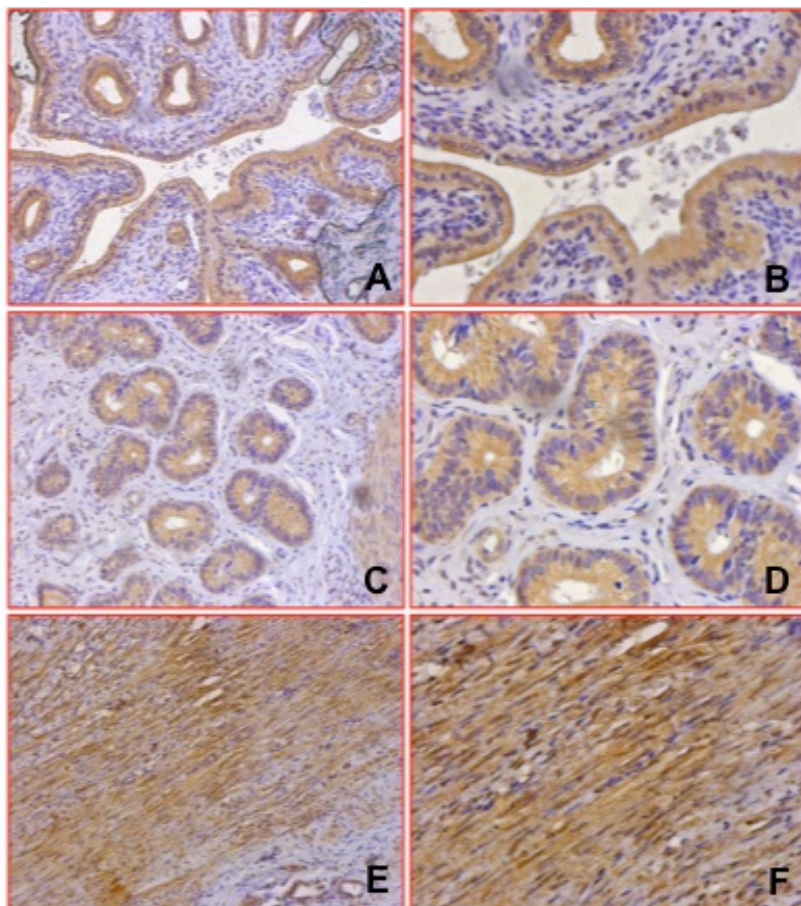


Figura 04: Detecção imunoistoquímica de receptores de FAS-L, sendo considerados núcleos positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azuis. “A” receptores de FAS-L no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de FAS-L no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de FAS-L na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de FAS-L na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de FAS-L na região muscular da cérvix aumento 200X, “F” receptores de FAS-L na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

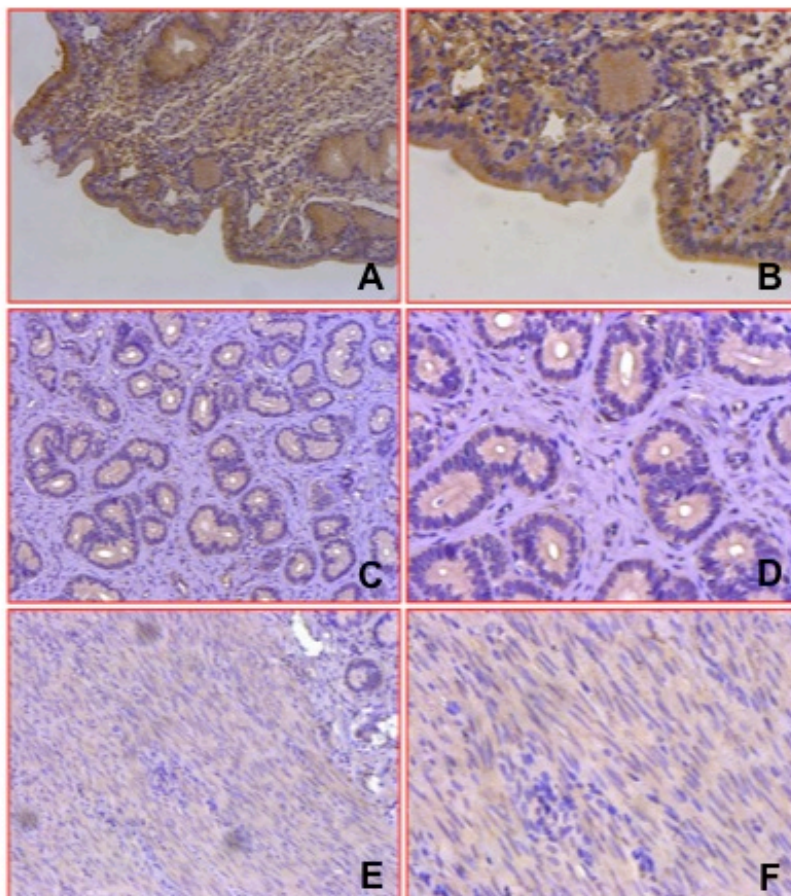


Figura 05: Detecção imunoistoquímica de receptores $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$, sendo considerados núcleos positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azuis. “A” receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$ no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$ no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$ na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$ na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$ na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de $\text{PGF2}\alpha\text{-R}$ na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

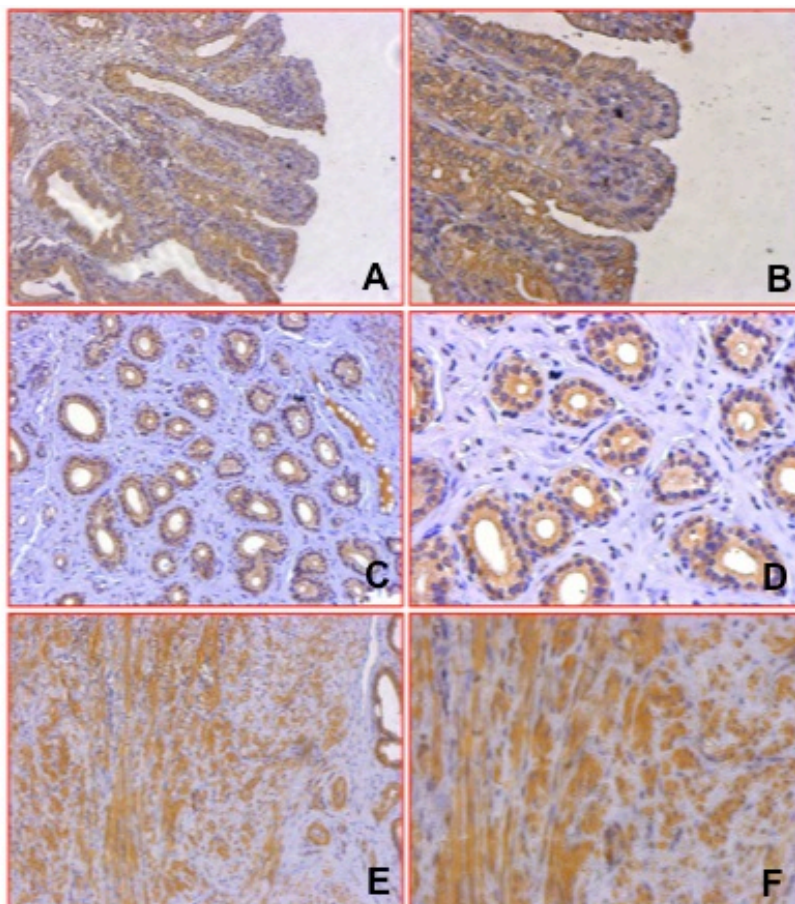


Figura 06: Detecção imunoistoquímica de receptores COX-2, sendo considerados núcleos positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azuis. “A” receptores de COX-2 no epitélio luminal da cérvix aumento 200X; “B” receptores de COX-2 no epitélio luminal da cérvix aumento 400X; “C” receptores de COX-2 na região glandular e estroma da cérvix aumento 200X; “D” receptores de COX-2 na região glandular e estroma da cérvix aumento 400X; “E” receptores de COX-2 na região muscular da cérvix aumento 200X; “F” receptores de COX-2 na região muscular da cérvix aumento 400X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

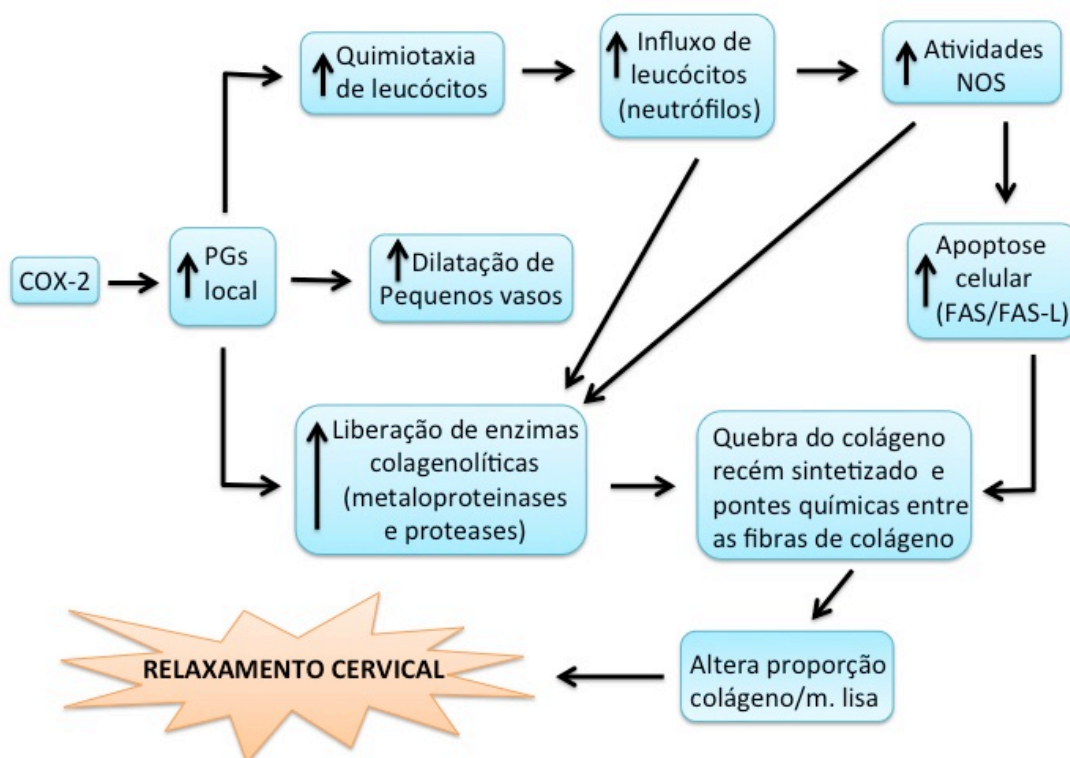


Figura 7: Fluxograma com a hipótese da interferência dos receptores estudados (e-NOS, i-NOS, FAS, FAS-L, PGF2 α -R e COX-2) na cascata que leva à abertura cervical. Adaptado de NUNES et al., 1999; BARBAS et al., 2001; KELLY, 2002; LERMA et al., 2008; CHATDARONG et al., 2010; KUNKITTI et al., 2011; TAMADA et al., 2012; KAUFMANN et al., 2012; HANSFORD et al., 2013; GOLBERG, 2014.

10. TRABALHO CIENTÍFICO 2

O artigo científico será encaminhado a Veterinária e Zootecnia (UNESP).

A revista Veterinária e Zootecnia tem conceito qualis B3 no ano de 2014. As normais para a submissão do manuscrito estão descritas em : <http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/about/submissions#authorGuidelines>

FATORES ENVOLVIDOS NOS MECANISMOS DE ABERTURA CERVICAL EM CADELAS COM PIOMETRA

RESUMO

No Brasil existe uma grande população de cadelas com risco de desenvolver um quadro de piometra, pois apenas uma pequena porcentagem de cadelas sadias é normalmente submetida à ovariosalpingohisterectomia eletiva. A patogênese da piometra canina não é completamente esclarecida e pode se apresentar de forma aberta ou fechada, caracterizada pela presença ou ausência de secreção vaginal, respectivamente. O relaxamento cervical é um fator importante para o diagnóstico, para o estabelecimento de um prognóstico e para a escolha de um tratamento eficiente. O relaxamento cervical, independente do ciclo estral, poderia também facilitar a realização de exames citológicos e histopatológicos do endométrio para diagnóstico de processos inflamatórios e neoplásicos. Inúmeros fatores devem ser considerados quando se estuda os mecanismos de abertura e fechamento cervical, tais como: a concentração sérica de estrógeno e progesterona, os receptores hormonais no útero, a porcentagem de colágeno na cérvix, infiltrado inflamatório, prostaglandinas, interleucinas e óxidos nítricos. O objetivo desta revisão bibliográfica é elucidar possíveis fatores envolvidos nos mecanismos de abertura cervical em cadelas portadoras de piometra.

palavras-chave: piometra, cérvix, cadela

FACTORS INVOLVED IN OPENING CERVICAL MECHANISMS IN BITCHES WITH PYOMETRA

ABSTRACT

In Brazil there is a large population of dogs at risk of developing a framework for pyometra, because only a small percentage of healthy bitches is usually underwent elective ovariohysterectomy. Pathogenesis of canine pyometra is not fully understood and can be presented in open or closed form, characterized by the presence or absence of vaginal secretion, respectively. The cervical relaxation is an important factor for diagnosis, to establish a prognosis and for choosing an effective treatment. The cervical relaxation, regardless of the estrous cycle, would also facilitate the realization of cytological and histopathological tests for diagnosing endometrial inflammatory and neoplastic processes. Numerous factors must be considered when studying the mechanisms of cervical opening and closing, such as the serum concentration of estrogen and progesterone hormone receptors in the uterus, the percentage of collagen in the cervix, inflammatory infiltrate, prostaglandins, interleukins and nitric oxides. The purpose of this literature review is to elucidate the factors involved in the mechanisms of cervical opening in bitches suffering from pyometra.

keywords: pyometra, cervix, bitche

FACTORES QUE INTERVIENEN EN LOS MECANISMOS DE APERTURA CERVICAL EN PERRAS CON PIOMETRA

RESUMEN

In Brazil there is a large population of dogs at risk of developing a framework for pyometra, because only a small percentage of healthy bitches is usually underwent elective ovariohysterectomy. Pathogenesis of canine pyometra is not fully understood and can be presented in open or closed form , characterized by the presence or absence of vaginal secretion, respectively. The cervical relaxation is an important factor for diagnosis, to establish a prognosis and for choosing an effective treatment. The cervical relaxation, regardless of the estrous cycle, would also facilitate the realization of cytological and

histopathological tests for diagnosing endometrial inflammatory and neoplastic processes. Numerous factors must be considered when studying the mechanisms of cervical opening and closing, such as the serum concentration of estrogen and progesterone hormone receptors in the uterus, the percentage of collagen in the cervix, inflammatory infiltrate, prostaglandins, interleukins and nitric oxides. The purpose of this literature review is to elucidate the factors involved in the mechanisms of cervical opening in bitches suffering from pyometra.

palabras claves: piometra, cervix, perra

1. INTRODUÇÃO

A cadela é uma espécie monoéstrica anual, não estacional, sendo que as ovulações ocorrem uma ou duas vezes ao ano com intervalos de cinco a doze meses (1). Nos últimos anos o conhecimento a respeito da fisiologia reprodutiva dos cães aumentou muito, mas doenças importantes e frequentes na clínica reprodutiva, como a piometra, ainda não são completamente elucidadas, existindo inclusive controversas entre os autores quanto a sua etiologia (2).

No Brasil existe uma grande população de cadelas com risco de desenvolver um quadro de piometra, pois apenas uma pequena porcentagem de cadelas sadias são normalmente submetidas à ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva. Em nosso país a maioria das castrações é realizada como consequência de alterações clínicas. A situação é diferente em outros países onde a prática da castração é realizada em mais de 85% das cadelas (3).

A patogênese da piometra canina não é completamente esclarecida, a despeito de décadas de estudo sobre a etiologia desta doença. O conceito de Síndrome Hiperplasia Endometrial Cística/Piometra introduzido por Dow (4-5), sugere que mudanças hormonais são responsáveis por um quadro de hiperplasia endometrial cística (HEC) que tornam o útero mais susceptível a infecção bacteriana secundária. Dow (5) e Sandholm et al. (6) propuseram que a endometrite subaguda é seguida pela HEC, a qual predispõe a piometra.

Doenças uterinas ligadas com o ciclo estral são importantes causas de infertilidade em carnívoros. Alterações hormonais resultantes de uma fase proliferativa longa, folículos ovarianos persistentes ou cistos ovarianos e

infecções bacterianas apresentam uma influencia importante no útero provocando sua degeneração (7).

A piometra pode se apresentar de forma aberta ou fechada, caracterizada pela presença ou ausência de secreção vaginal, respectivamente. A cérvix é considerada uma barreira física importante prevenindo a infecção ascendente pela secreção de muco e constrição. Na mulher, a dilatação cervical durante o parto correlaciona-se com a extensão do infiltrado de neutrófilos, entretanto, os mecanismos de dilatação cervical nas cadelas não são totalmente esclarecidos (8).

A abertura ou fechamento da cérvix nas cadelas são ciclo dependente. Sob a influência estrogênica a cérvix se abre permitindo a entrada de bactérias da microbiota normal da vagina para o interior do lúmen uterino. Os produtos da secreção das glândulas, inicialmente estéreis, contêm nutrientes e pH favoráveis ao crescimento bacteriano e, com a diminuição da resposta inflamatória, a piometra pode se instalar (9, 10). Trabalhos envolvendo investigação sobre a indução de piometra canina demonstraram que entre os dias onze e trinta, após o pico de LH, o útero torna-se mais susceptível a infecção (11).

Algumas cadelas com piometra aberta podem apresentar um fechamento da cérvix durante o curso da doença, assim como cadelas com piometra fechada podem apresentar abertura cervical. Esse mecanismo de abertura e fechamento cervical pode ser devido a interações hormonais, ou pode ser apenas um fator mecânico pela pressão exercida pelo próprio acúmulo de secreção no interior do útero. De qualquer forma, o mecanismo de relaxamento cervical necessita de maiores estudos.

A taxa de mortalidade da piometra é de 3 a 4 % em países desenvolvidos que apresentam modernas rotinas de tratamento e um atraso no diagnóstico e/ou tratamento pode conduzir esses animais a sépsis e a um desfecho fatal (12). As piometras abertas são menos tóxicas e mais fáceis de serem tratadas se os mecanismos de relaxamento cervical fossem melhor esclarecidos poderíamos, no mínimo, estimular a abertura cervical e induzir a eliminação do conteúdo uterino. Esta revisão visa atualizar conhecimento sobre a piometra canina principalmente no tocante aos mecanismos de abertura e fechamento cervical nas cadelas.

2. FISILOGIA DO CICLO ESTRAL

O ciclo estral dura de 5 a 12 meses e consiste de 4 fases consecutivas: anestro (com duração de 80 a 240 dias), proestro (3 a 16 dias), estro (4 a 12 dias) e um diestro relativamente longo (60 a 90 dias). A puberdade nas cadelas aparece entre os 6 e 14 meses de idade, variando de acordo com a raça e porte do animal (13). O ciclo estral das cadelas é conhecido como um dos mais primitivos de todos os mamíferos (7).

Dentre os hormônios relevantes no ciclo estral das cadelas o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH), estrógeno e progesterona são os mais importantes. Sob a influência do FSH, os folículos ovarianos se desenvolvem e as células foliculares produzem estrógenos, que estimulam a proliferação das células epiteliais da mucosa vaginal, aumentam a espessura da camada endometrial, promovem abertura da cérvix, aumentam o fluxo sanguíneo e a resposta inflamatória celular. As respostas ou efeitos provocados pelos estrógenos e progesterona no útero têm efeito cumulativo a cada ciclo estral (9, 10).

A piometra tem sido associada a repetidas respostas ao estrógeno durante o estro, seguida por longos intervalos de dominância da progesterona levando a modificações no endométrio (11, 14). A estimulação progestacional resulta em proliferação do endométrio, secreção das glândulas uterinas e diminuição das contrações do miométrio. A inibição leucocitária no útero sensibilizado pela progesterona facilita a infecção bacteriana. O endométrio, sob o estímulo da progesterona, se hipertrofia devido a um aumento no número e no tamanho de suas glândulas, que aumentam suas atividades secretoras e um fluido estéril pode se acumular no lúmen do útero. Essas respostas aos efeitos hormonais podem ser mais exacerbadas com o uso de progestágenos exógenos (14-16).

3. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ABERTURA CERVICAL

A cérvix apresenta poucas fibras musculares lisas e grande quantidade de tecido conjuntivo. A mucosa cervical é constituída por um epitélio prismático simples de células produtoras de muco e uma lâmina própria onde se encontram as glândulas cervicais. Na fase secretória do ciclo estral, os elevados níveis de progesterona influenciam essas glândulas a produzirem um

muco viscoso, que impede a passagem de microorganismos e de espermatozoides para o interior da cavidade uterina (17).

As propriedades mecânicas da cérvix são derivadas da concentração de colágeno, o músculo liso constitui apenas 15% da massa do órgão. Feixes de colágenos proporcionam uma rigidez que pode ser alterada rapidamente por ação das colagenases. A fonte de colagenase e seu controle são temas atuais de pesquisas e debates. Os colágenos da cérvix são principalmente dos tipos I, III e IV, tornando a cérvix uma estrutura bastante rígida sendo a colagenase a enzima necessária para o relaxamento do órgão (18).

Os tratamentos clínicos da piometra envolvem medicamentos que estimulam a contração uterina, além disso, o relaxamento cervical é um fator importante para o diagnóstico, para o estabelecimento de um prognóstico e escolha de um tratamento eficiente, pois a parede uterina muitas vezes está friável e pode se romper contaminando a cavidade abdominal (19).

Os mecanismos envolvidos na abertura e fechamento da cérvix não são completamente elucidados e inúmeros fatores devem ser considerados.

3.1. DOSAGEM SÉRICA DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA

O estrógeno induz a proliferação das glândulas endometriais e a progesterona induz a ramificação dessas glândulas, sendo também responsável pelo início da secreção glandular para o lúmen uterino (20).

Ainda é desconhecido o processo pelo qual podemos diferenciar a formação de piometra aberta ou fechada. Algumas hipóteses já foram levantadas, sendo a de Weiss et al. (1) bastante expressiva. Ao analisar a concentração hormonal de cadelas com diagnóstico de piometra, o estradiol não apresentou diferença significativa: piometra aberta, $43 \pm 6,5$ pg/mL; fechada, $56,3 \pm 11,9$ pg/mL. Quanto à análise da progesterona, os resultados apresentaram diferenças significativas sendo de $4,8 \pm 0,9$ ng/mL para a piometra aberta e de $13,2 \pm 5,5$ ng/mL para a piometra fechada.

No estudo realizado por Volpato (21) não foi observada diferença significativa entre as concentrações de progesterona quando foram comparados os grupos de piometra aberta (25 animais) e fechada (06 animais). Nesse trabalho foram observadas variações individuais de 0,54 ng/mL a 35,43 ng/mL. Segundo o autor essa variação é devida a fase do ciclo estral no qual

foi realizado o diagnóstico de piometra. Resultado semelhante foi encontrado no estudo realizado por Tamada et al. (19) onde não foi constatado correlação entre a dilatação da cérvix em cadelas com piometra e o número de folículos do ovário.

3.2. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS E DE PROGESTERONA

Investigações têm explorado a possibilidade da piometra canina ser induzida por uma resposta exagerada do útero a níveis normais de hormônios (22). A expressão de receptores parece ser diferente no útero comprometido com HEC e piometra quando comparado com o de cadelas sadias (20, 22).

Estudos sobre receptores hormonais em útero de cadelas já foram realizados. Segundo Kunkitti et al. (23), os receptores de estrógeno e progesterona controlam a abertura e fechamento cervical durante o ciclo estral, porém, o mecanismo envolvido, as mudanças e associações bioquímicas que ocorrem nesse processo não são totalmente esclarecidos.

No estudo realizado por De Bosschere et al. (24) avaliou-se, por ensaio imunistoquímico, a expressão de receptores estrogênicos (RE) e receptores de progesterona (RP) no útero de cadelas normais, com piometra e com HEC. As contagens de RE e RP foram mais elevadas nos animais com HEC, quando comparadas com útero de cadelas normais ou portadoras de piometra e a menor expressão desses receptores foi verificada em cadelas com piometra. As diferenças na expressão de receptores de estrógeno e progesterona sugerem fatores distintos na patogênese da HEC e da piometra. Assim, pode-se deduzir que a piometra é desencadeada por uma cascata de fenômenos iniciada apenas pela infecção bacteriana e não pela HEC.

Em consequência da expressão aumentada do RE em cadelas com HEC, o endométrio permanece receptivo ao estrógeno, mesmo com níveis circulante baixos. Isto pode esclarecer a contínua proliferação das glândulas endometriais durante o estágio de forte influência progesterônica. A ação prolongada simultânea do estrógeno e da progesterona poderia explicar as mudanças na proliferação cística que são características da piometra (20).

Volpato et al. (25), utilizando a técnica de imunistoquímica, pesquisaram receptores de estrógeno α e β no útero e cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada. Nesse estudo foi realizada a identificação e

quantificação desses receptores tanto nas regiões glandular e do estroma do uterino como nas regiões epitelial, glandular e do estroma da cérvix. Não foi verificada diferença estatística entre os grupos piometra aberta e piometra fechada em relação à expressão dos receptores α e β e dos locais avaliados.

Comparando a imunorreatividade dos RE α entre as diferentes regiões do útero, Volpato et al. (25) observaram que o epitélio glandular foi corado com uma intensidade mais forte do que o estroma, determinando uma concentração maior de RE α nessa região. Também na cérvix, o epitélio glandular foi corado mais intensamente quando comparado com o estroma e o epitélio luminal. Levando em consideração que a concentração de receptores é diretamente proporcional a intensidade da marcação, a região com o maior número de RE α no útero e cérvix é o epitélio glandular. Esses resultados são contrários aos observados por Dhaliwal et al. (26) que encontraram um escore muito baixo de RE e RP no epitélio glandular do útero.

O número de núcleos positivos para receptores de estrógeno e progesterona não diferiram entre as cadelas com piometra aberta e piometra fechada (23, 25), entretanto, Volpato et al. (25) identificaram diferenças na marcação dos RPs. Houve uma maior concentração de receptores de progesterona na cérvix de cadelas com piometra fechada e a reatividade foi mais intensa no estroma quando comparada com o epitélio glandular e luminal, existindo portanto, um maior número de RPs no estroma quando comparado as outras regiões da cérvix.

Receptores de P4 são menos expressos em cadelas com HEC/piometra, quando comparadas às fêmeas sadias, durante todo o diestro. Escores imunistoquímicos de RPs nas várias camadas do útero com HEC/piometra durante o diestro foram também baixos de acordo com Dhaliwal et al. (26).

3.3. COLÁGENOS I E III

O relaxamento da cérvix é regulado pela musculatura lisa, tecido fibroso e elastina. A remodelação da matriz extracelular tem um papel importante na dilatação cervical pela degradação do colágeno. Em trabalho realizado por Chatdarong et al. (27), foi postulado que o útero de cadelas cíclicas tem uma maior proporção de colágeno comparado com musculatura lisa, provavelmente associada ao aumento do estradiol durante o estro. Isso gera uma diminuição

da resistência à tração, causando o relaxamento da cérvix. Resultado semelhante é observado nas cadelas com piometra de cérvix aberta, sugerindo que a abertura da cérvix é associada a um aumento na proporção de colágenos frente a fibras musculares.

Dezenove tipos de colágenos já foram identificados e a cérvix inclui principalmente os tipos de colágenos I e III. Na cérvix aberta não se observam fibras elásticas no endométrio e as fibras de colágeno se encontram numa densidade menor quando comparadas a cérvix fechada, onde as fibras de colágeno se encontram mais densas e ordenadas. A medida que a dilatação cervical aumenta, as fibras de colágeno se tornavam mais finas e os espaços entre as fibras se tornam maiores (19).

Volpato et al. (25), utilizando a técnica de imunistoquímica, identificaram receptores para colágeno I e III nas regiões glandular e muscular, tanto do útero quanto da cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada. Os resultados não identificaram diferenças significativas entre as duas condições avaliadas e nem entre as regiões investigadas. Um aumento nas concentrações de colágeno não foi identificado na piometra fechada conforme sugerido por Tamada et al. (19).

3.4. AGENTES ETIOLÓGICOS E INFILTRADO INFLAMATÓRIO

A interação da progesterona e do estrógeno é importante no desenvolvimento da piometra, mas a progressão e severidade dessa enfermidade são complicadas com a migração secundária de bactérias por via ascendente (5).

A bactéria com maior incidência no útero de cadelas com piometra é a *Escherichia coli*, isolada de 57% a 96% das amostras de úteros. Ocasionalmente, outras bactérias como *Staphilococcus schleiferi*, *Staphilococcus epidermidis*, *Streptococcus sp*, *Streptococcus canis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa* são isoladas do útero de animais infectados (1, 12, 28). A origem destes microorganismos é o próprio intestino e trato urinário (1, 29, 30).

A infecção da cérvix e útero podem levar a um enfraquecimento da cérvix podendo ser um fator contribuinte nos casos de trabalho de parto prematuro. A atividade da *prostaglandina desidrogenase* é reduzida na

presença de infecções permitindo, portanto, a atuação da prostaglandina na cérvix (1, 18).

O relaxamento cervical nas cadelas é normalmente associado com a fase de proestro e estro. A contaminação bacteriana do útero ocorre durante essas fases do ciclo estral, não havendo, portanto, diferença entre a piometra aberta e fechada em relação ao momento da contaminação bacteriana. Volpato (21) não encontrou diferença no agente bacteriano isolado nas cadelas com piometra aberta e fechada.

A dilatação da cérvix em fêmeas normais e com doenças uterinas podem ser controladas por mecanismos diferentes. Expressões dos receptores são influenciadas pelo estágio do ciclo estral em cadelas normais, enquanto a infiltração de neutrófilos no tecido cervical também está envolvida na dilatação cervical e pode ocorrer em cadelas com piometra, independente da fase do ciclo estral (23).

Remodelações estruturais da cérvix durante o parto resultam na rápida abertura cervical. Esse processo é caracterizado por uma infiltração de neutrófilos e macrófagos. Os leucócitos parecem participar da reorganização do tecido conjuntivo da cérvix durante o parto e esse mesmo mecanismo talvez ocorra nos casos de piometra aberta nas cadelas (23)

O relaxamento da cérvix está associado com um influxo de leucócitos, incluindo os neutrófilos, que têm um elevado potencial para a liberação de colagenase. O colágeno proporciona a rigidez da cérvix e há uma probabilidade de que granulócitos estejam envolvidos no processo de amadurecimento fisiológico normal da cérvix. Os neutrófilos são importantes fontes de colagenases específicas que estão contidas dentro do subconjunto de grânulos do citoplasma. O óxido nítrico, outra substância vasoativa, também está envolvido nos efeitos diretos sobre os neutrófilos, mas seus mecanismos ainda não estão esclarecidos (18).

A invasão de células inflamatórias tem sido sugerida como uma possível causa de degradação de colágenos e relaxamento cervical. Em mulheres, o grau de dilatação cervical está diretamente relacionado com a extensão do infiltrado neutrofílico que pode, posteriormente, produzir enzimas colagenolíticas, como proteases e metaloproteinases. O aumento dessas enzimas pode degradar o colágeno recém-sintetizado e assim, diminuir a

proporção colágeno/musculatura lisa na cérvix interferindo no grau de relaxamento cervical em cadelas com doenças uterinas (23).

No trabalho realizado por Volpato et al. (31) utilizando seis cadelas com piometra aberta e seis cadelas com piometra fechada, não foi encontrada diferença significativa entre o infiltrado leucocitário observado na cérvix de cadelas com piometra aberta ou fechada, tanto no total dos leucócitos como na quantificação de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos e plasmócitos. Não foi encontrado mastócito. De acordo com os resultados a infiltração leucocitária não está associada a abertura cervical na piometra canina.

3.5. PROSTAGLANDINAS

O mecanismo de dilatação da cérvix inclui uma série de interações que ocorrem através de reações químicas estimuladas por diferentes hormônios. A enzima ciclo-oxigenase-2 está envolvida com o aumento local de prostaglandina E2 (PGE2); esse aumento conduz a diversas alterações associadas ao amadurecimento cervical, como a dilatação dos pequenos vasos, aumento da degradação do colágeno, aumento do ácido hialurônico, aumento da quimiotaxia dos leucócitos e aumento do estímulo e liberação da interleucina-8 (IL-8) (32).

A deposição de PGE2 na vagina ou cérvix da mulher, ovelha, égua e vaca origina um relaxamento e dilatação cervical *in vivo*, independentemente do estado fisiológico e das concentrações de progesterona. Na mulher, a aplicação de prostaglandinas na cérvix, antes do parto induz a dilatação cervical (33, 34)

Algumas prostaglandinas diminuem a atividade contrátil da musculatura cervical, sendo a PGE2 aquela que apresenta uma atividade inibidora mais potente mesmo em doses baixas. As prostaglandinas facilitam a dilatação cervical ao induzirem a liberação de collagenases que promovem a quebra do colágeno e, como consequência, o relaxamento cervical. O misoprostol, um análogo sintético da PGE1, tem se mostrado altamente eficiente na indução da abertura cervical e no estímulo da atividade contrátil do miométrio (18, 33, 34).

O mecanismo de ação das prostaglandinas ainda não é completamente elucidado. É sabido que as prostaglandinas estão envolvidas no amadurecimento cervical fisiológico, sendo os fibroblastos cervicais iniciadores

do processo controlando a permeabilidade e dilatação dos pequenos vasos sanguíneos. As prostaglandinas podem também apresentar um efeito direto na estimulação da matriz metaloproteinase. O efeito vasoativo da PGE2 facilita a penetração de leucócitos na cérvix e os neutrófilos abundantes na circulação periférica são uma fonte importante de colagenase para o amadurecimento cervical final (18).

3.6. INTERLEUCINA

A etiopatologia da piometra vem sendo estudada há décadas e pouco se sabe sobre a ocorrência das células do sistema imunitário no útero canino. Sem dúvida, a imunidade uterina local, ou a falta dela, tem uma importância no desenvolvimento da piometra (35).

Na piometra temos o recrutamento de leucócitos, citocinas e quimiocinas que desempenham um papel crucial na regulação da inflamação e da circulação de células do sistema imunológico. Como esperado, citocinas pró-inflamatórias precoces (IL-1B e TNF-a) foram encontradas em alta quantidade nos úteros afetados. Em contraste, a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 permaneceram inalterados quando comparadas a úteros normais. (35)

A presença e migração de células inflamatórias podem causar o aumento das atividades do óxido nítrico sintetase, juntamente com outros agentes inflamatórios como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa e interleucina-8 (IL-8). Esses mecanismos parecem estar envolvidos no amadurecimento cervical devido ao processo de remodelação do tecido inflamatório e quebra de pontes químicas entre as fibras de colágeno (32).

O início do amadurecimento cervical nas mulheres pode envolver agentes quimiotáticos neutrofílicos, tais como a IL-8, que tem sido utilizada para o amadurecimento de cérvix em cobaia. A estimulação da IL-8 pode ocorrer nos fibroblastos ou em monócitos, em sinergismo com a prostaglandina E2 (18, 32).

A IL-8 tem um efeito seletivo na estimulação da liberação de metaloproteinases e grânulos que contêm a colagenase. O neutrófilo é uma fonte quase ilimitada de colagenase que pode ser carregada para os tecidos por agentes quimiotáticos. A IL-8 de indução e de ativação dos neutrófilos causa o

relaxamento cervical em mulheres da mesma maneira que a IL-8 exógena induz a maturação em cobaias (18).

Estudos recentes indicam que a expressão local de IL-8 na cérvix está associado ao relaxamento e a infiltração de neutrófilos. Tamada et al. (19) relataram que a expressão de IL-8 foi positivamente associada com a permeabilidade e o número de neutrófilos na cérvix, o que sugere que as interleucinas podem concentrar neutrófilos na região e influenciar a permeabilidade.

A interleucina 17, originalmente identificado como linfócito T citotóxico, foi descrita pela primeira vez em 1993 em ratos e humanos. Dois anos depois, esta proteína foi descrita como uma nova citoquina e chamada interleucina 17. Essa interleucina já foi encontrada em doenças de vias aéreas, gastrointestinais, articulações, de glândulas mamárias e útero de cadelas com piometra (35, 36). IL-17 está envolvida na resposta imune inata de muitos patógenos, incluindo *E. coli* e desempenha um papel na regulação da inflamação no trato reprodutivo (35, 37)

Todos esses resultados mostram que as interleucinas são importantes em doenças inflamatórias, mas ainda há poucos resultados sobre seu papel na piometra canina sendo um importante campo de estudo para futuro.

3.7. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (ON) é um radical livre altamente reativo, que desempenha importantes funções em diversos sistemas fisiológicos. Ao longo da última década, diversas linhas de pesquisa convergiram para demonstrar que o ON é um modulador de processos fisiológicos e patológicos em mamíferos (38).

O ON atua como vasodilatador sendo sintetizada no processo de conversão de L-arginina em l-citrulina pela ON sintetase (NOS). Existem três isoformas: endotelial (e-NOS), neuronal (n-NOS) e induzível (i-NOS). Dessas, as duas primeiras isoformas são dependentes de cálcio, enquanto iNOS é induzida por citocinas, fatores de crescimento e reação inflamatória (39, 40).

O ON parece desempenhar um papel importante no processo de relaxamento cervical, visto que seu aumento leva a uma elevação na atividade de metaloproteinase, apoptose celular e síntese de glicosaminoglicano. Todas

estas modificações estão associadas com o processo de amadurecimento cervical (32).

Diversos agentes podem ser utilizados na tentativa de relaxar a cérvix. Farmacologicamente, são quimiocinas como a interleucina, análogos da prostaglandinas e ON. A NOS é encontrada na cérvix de ratos, cobaias e suínos e tem sua concentração elevada durante o parto. As mudanças observadas na cérvix de suínos após administração de nitroprussiato de sódio assemelham-se àquelas após maturação fisiológica normal ao nascimento, com influxo de monócitos e granulócitos (18).

Pesquisas recentes estão investigando a ação do sistema óxido nítrico sintetase/óxido nítrico. Esse sistema parece estar associado a regulação do miométrio e da cérvix durante a gestação e o parto das mulheres. Estudos com ratos demonstraram que a atividade do óxido nítrico sintetase/óxido nítrico está associada com a latência uterina. Previamente ao amadurecimento cervical, a atividade é baixa e, em seguida, aumenta no momento do trabalho de parto, sendo associada com o relaxamento da cérvix. O sistema óxido nítrico sintetase/óxido nítrico é a via final na indução de mudanças químicas associadas com maturação cervical (32).

4. CONCLUSÃO

A piometra é uma doença frequente nas cadelas e a despeito de décadas de pesquisa ainda são necessários estudos utilizando ferramentas mais sofisticadas e grupos de animais em fases hormonais bem definidas a fim de compreender melhor sua etiologia e os mecanismos de abertura e fechamento cervical. Há um consenso de que as lesões são resultados de uma interação hormonal e participação bacteriana, mas apesar dos vários estudos sobre o tema, clinicamente, a síndrome piometra ainda representa um desafio para a maioria dos profissionais. A abertura cervical mediada por fármacos poderia facilitar o tratamento de animais portadores de piometra fechada tornando o acesso ao útero mais seguro. A eliminação da secreção uterina por meio de drogas ecbólicas e antibioticoterapia poderia ser o tratamento de escolha naqueles animais com finalidade reprodutiva. O relaxamento cervical, independente do ciclo estral, poderia também facilitar a realização de exames citológicos e histopatológicos do endométrio para diagnóstico de processos

inflamatórios e neoplásicos. Portanto o entendimento de mecanismos de abertura cervical poderia auxiliar na clínica reprodutiva.

Após revisão sobre o tema, fatores como os agentes etiológicos causadores da infecção uterina, o infiltrado inflamatório, a concentração sérica de progesterona e estrógeno e os receptores de estrógenos não parecem estar envolvidos nos mecanismos de abertura e fechamento cervical. Em contra partida, os receptores de progesterona e os fatores envolvidos na degradação e remodelamento dos colágenos como prostaglandinas, interleucinas e óxido nítrico parecem interferir na abertura cervical.

5. REFERÊNCIAS

- 1-WEISS RR, CALOMENO MA, SOUSA RS, BRIERSDORF SM, MURADÁS P. Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela. Arch. Vet. Sci. 2004;9(2):81-7.
- 2-GOERICKE-PESCH S, SCHMIDT B, FAILING K, WEHREND A. Changes in the histomorphology of the canine cervix though the oestrus cycle. Theriogenology. 2010;74(6):1075-81.
- 3-HAGMAN R, REEZIGT BJ, LEDIN HB, KARLSTAM E. Blood lactate levels in 31 female dogs with pyometra. Acta Vet. Scand. 2009;51(2):11-9.
- 4-DOW C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. The Veterinary Record. 1957;69:1409-15.
- 5-DOW C. The cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch. The Veterinary Record. 1958;70:1102-8.
- 6-SANDHOLM M, VASENIUS H, KIVISTO AK. Pathogenesis of canine pyometra. JAVMA. 1975;167(11):1006-10.
- 7-KEMPISTY B, BUKOWSKA D, WOZNA M, PIOTROWSKA H, JACKOWSKA M, ZURAW A, et al. Endometritis and pyometra in bitches: a review. Veterinarni Medicina. 2013;58(6):289-97.
- 8-CHATDARONG K, KUNKITTI P, SRISUWATANASAGUL S. P2 Distribution of Oestrogen Receptor and Progesterone Receptor and Leukocyte Infiltration in Canine Cervical Tissue. Proceedings 7th Chulalongkorn University Veterinary Science the Animal Company. 2008;1:58.
- 9-OLIVEIRA KS. Cystic endometrial hyperplasia complex. Acta Sci Vet. 2007;35(2):270-2.

- 10-OLIVEIRA PC, LOPES MD, THOMÉ HE, BALIEIRO JCC. Avaliação citológica, histológica e hormonal de cadelas normais e com complexo hiperplasia endometrial cística/piometra. *Vet e Zootec*. 2008;15(1):150-9.
- 11-SMITH FO. Canine pyometra. *Theriogenology*. 2006;66:610–2.
- 12-SHARIF H, HAGMAN R, WANG L, ERIKSSON S. Elevation of serum thymidine kinase 1 in a bacterial infection: Canine piometra. *Theriogenology*. 2013;79:17-23.
- 13-CONCANNON PW. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci*. 2011;124:200–10.
- 14-PRETZER SD. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. *Theriogenology*, 2008;70:359-63.
- 15-DE BOSSCHERE H, DUCATELLE R, VERMEIRSCH H, VAN DEN BROECK W. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected. *Theriogenology*. 2001;55:1509-19.
- 16-RAGNI RA. Pyometra in a bitch following unusual sterilisation. *Jour Small Anim Pract*. 2005;46:39-40.
- 17-JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. Aparelho Reprodutor Feminino. In: *Histologia Básica*. 9.ed.Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. p:367-88, 1999.
- 18-KELLY RW. Inflammatory mediators and cervical ripening. *Jour Reprod Immun*. 2002;57:217–24.
- 19-TAMADA H, KAWATA N, KAWATE N, INABA T, KIDA K, HATOYA S, et al. Factors associated with patency of the uterine cervix in bitches with piometra. *Theriogenology*. 2012;93:1203-10.
- 20-DE COCK H, VERMEIRSCH H, DUCATELLEL R, DE SCHEPPER J. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cystic-endometritis-pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*. 1997;48:1035-47.
- 21-VOLPATO R. Análise clínica e imunoistoquímica do útero e cérvix de cadelas com o diagnostico de piometra. Botucatu. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2011.
- 22-VERVERIDISA HN, BOSCOA CM, STEFANAKISB A, SARATSISA P, STAMOUA AI, KRAMBOVITISB E. Serum estradiol-17b, progesterone and

espective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra Theriogenology. 2004;62:614-33.

23-KUNKITTI P, SRISUWATANASAGUL S, CHATDARONG K. Distribution of estrogen receptor alpha and progesterone receptor, and leukocyte infiltration in the cervix of cyclic bitches and those with pyometra. Theriogenology. 2011;75:979-87.

24-DE BOSSCHERE H, DUCATELLE R, TSHAMALA M, CORY M. Changes in sex hormone receptors during administration of progesterone to prevent estrus in the bitch. Theriogenology. 2002;58:1209-17.

25-VOLPATO R, MARTIM I, RAMOS RS, TSUNEMI RH, LAUFER-AMORIM R, LOPES MD. Imunoistoquímica de útero e cérvix de cadelas com diagnóstico de piometra. Arq Bras Med Vet Zootec. 2012;64(5):1109-17.

26-DHALIWAL GK, ENGLAND GCW, NOAKES DE. Oestrogen and progesterone receptors in the uterine wall of bitches with cystic endometrial hyperplasia/pyometra. Veterinary Record. 1999;145:455-7.

27-CHATDARONG K, LINHARATTANARUKSA P, SIRIVAIYAPONG S, SRISUWATAMASAKUL S. The proportions of Smooth Muscle and Collagen in the Cervical Tissue of Bitches during Various Stages of the Estrous Cycle and Bitches Developing. Proceedings 9th Chulalongkorn University Veterinary Science the Animal Company. 2010;1:129.

28-HAGMAN R, KUHN I. *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: Comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. Vet Microbi. 2002;84:143–53.

29-COGGAN JA, OLIVEIRA CM, FAUSTINO M, MORENO AM, VON SYDOW AC, MELVILLE PA, BENITES NR. Microbiological study of intrauterine secretion from bitches with pyometra and research of virulence factors of *Escherichia coli* isolates. Arq Instit Biol. 2004;71:1-749.

30-BARTOSKOVA A, VITASEK R, LEVA L, FALDYNA M. Hysterectomy leads to fast improvement of haematological and immunological parameters in bitches with pyometra. Jour Small Anim Pract. 2007;48:564–8.

31-VOLPATO R, REIS MV, RODRIGUES MMP, TSUNEMI RH, LOPES MD. Infiltrado leucocitário em cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada. Anais do XX CBRA. 2013;37(2):171.

- 32-GOLDBERG AE. Role of various hormones in the process of cervical ripening. Disponível em : <<http://emedicine.medscape.com/article/263311-overview#aw-2aab6b5>> Acesso em: 08 março, 2013.
- 33-NUNES F, RODRIGUES R, MEIRINHO M. Randomized comparison between intravaginal misoprostol and dinoprostone for cervical ripening and induction of labor. *AJOG*. 1999;181(3):626-9.
- 34-BARBAS JP, GONÇALVES SC, MARQUES CC, HORTA AEM. Efeito da aplicação vaginal de agentes dilatadores do cérvix durante a fase folicular do ciclo em ovelhas. *Proceedings do III Congresso Ibérico de Reprodução Animal*. 2001:299-307.
- 35-BARTOSKOVA A, TURANEK-KNOTIGOVA P, MATIASOVIC J, ORESKOVIC Z, VICENOVA M, STEPANOVA H. γ δ T lymphocytes are recruited into the inflamed uterus of bitches suffering from piometra. *The Veterinary Journal*. 2012;94:303-8.
- 36-MENSIKOVA M, STEPANOVA H, FALDYNA M. Interleukin-17 in veterinary animal species and its role in various diseases: A review. *Cytokine*. 2013;64:11-7.
- 37-SCURLOCK AM, FRAZER LC, ANDREWS JR CW, O'CONNELL CM, FOOTE IP, BAILEY SL. Interleukin-17 contributes to generation of Th1 immunity and neutrophil recruitment during *Chlamydia muridarum* genital tract infection but is not required for macrophage influx or normal resolution of infection. *Infection and Immunity*. 2011;79:1349-62.
- 38-DIXIT VD, PARVIZI N. Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim Reprod Sci*. 2001;65:1-16.
- 39-STUEHR DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:217-30.
- 40-HAYASHIA KG, HOSOE M, TAKAHASHIA T. Placental expression and localization of endothelin-1 system and nitric oxide synthases during bovine pregnancy. *Anim Reprod Sci*