

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E ESPESSURA DO
ENDOMÉTRIO DE CADELAS EM DIFERENTES PERÍODOS DO DIESTRO**

VANESSA DA SILVA ALVES GOSSLER

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E ESPESSURA DO
ENDOMÉTRIO DE CADELAS EM DIFERENTES PERÍODOS DO DIESTRO**

VANESSA DA SILVA ALVES GOSSLER

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ines Cristina Giometti

636.089 26 Gossler, Vanessa da Silva Alves.
G679a Avaliação da proliferação celular e espessura do endométrio de cadelas em diferentes períodos do diestro / Vanessa da Silva Alves Gossler. – Presidente Prudente, 2015.
32 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal.) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2015.

Bibliografia.

Orientador: Ines Cristina Giometti.

1. AgNOR. 2. Cães. 3. Hematoxilina-eosina. 4. Útero. I. Título.

VANESSA DA SILVA ALVES GOSSLER

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E ESPESSURA DO
ENDOMÉTRIO DE CADELAS EM DIFERENTES PERÍODOS DO DIESTRO**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 25 de Setembro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Prof.^a Dr.^a Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL
Londrina - PR

Prof.^a Dr.^a Calië Castilho
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Dedico essa realização primeiramente a Deus por me conceder condições para superar os obstáculos que surgiram durante esta caminhada e à minha família pelo apoio e incentivo para alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial ao meu esposo Odair Santo Gossler pelo apoio e incentivo.

Agradeço ao corpo docente da Instituição pela contribuição para minha formação e enriquecimento de conhecimento e informação de forma a me preparar para esta conquista.

Agradeço especialmente a Professora Doutora InesCristinaGiometti não só pela orientação competente nesta dissertação, mas pela grande contribuição para meu amadurecimento pessoal e profissional.

Agradeço aos alunos de iniciação científica Aline Rosa de Azevedo, Priscila Carolina Gonçalves e Hugo Augusto Rigolo e em especial à colega de mestrado e amiga FrancislaineAneliza Garcia Santos pela grande colaboração no desenvolvimento do experimento.

Agradeço ao corpo de funcionários da Instituição, que sempre trabalharam de forma assídua e comprometida, a fim de dar condições e subsidio para as atividades realizadas, em especial à técnica de laboratórioCleonice Trevisan pelo auxílio.Agradeçopor último, mas não menos importante,à amiga Sueli Galhardo por ter me acolhido em Presidente Prudente durante estes dois anos.

Matar o sonho é matarmos-nos.
É mutilar a nossa alma.
O sonho é o que temos de realmente nosso, de impenetravelmente e
inexpugnavelmente nosso.

Fernando Pessoa

RESUMO

AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E ESPESSURA DO ENDOMÉTRIO DE CADELAS EM DIFERENTES PERÍODOS DO DIESTRO

O presente estudo teve o objetivo de determinar as características histológicas do endométrio de cadela, assim como a sua proliferação em momentos específicos do diestro nos dias 10, 20, 30, 40, 50 e 60 pós-ovulação, correlacionando a espessura do endométrio com o peso, glicemia e colesterol das cadelas. Para tanto, foram analisados histologicamente os cornos uterinos direito e esquerdo de 26 cadelas clinicamente saudáveis ovariohisterectomizadas aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a ovulação. Foram realizadas a coloração de hematoxilina-eosina e também a coloração pelo método de AgNOR. Todos os parâmetros foram avaliados pelo pressuposto de normalidade de Shapiro-Wilk e as amostras submetidas a ANOVA seguida de Tukey ($p < 0,05$). A correlação entre espessura de endométrio e peso, glicemia e colesterol plasmático foi verificada pelo método de Pearson ($p < 0,05$). O programa utilizado foi o BioEstat[®] versão 5.0. Concluiu-se que a espessura do endométrio não difere entre os dias pós-ovulação e que não tem correlação com o peso, glicemia ou o colesterol sérico das cadelas. Porém, há uma maior proliferação celular aos 40 dias pós-ovulação em relação aos 60 dias.

Palavras-chave: AgNOR; Cães; Hematoxilina-eosina; Útero.

ABSTRACT

EVALUATION OF CELL PROLIFERATION AND ENDOMETRIAL THICKNESS OF BITCHES IN DIFFERENT PERIODS OF DIESTRUS

This study aimed to determine the histological features of the endometrium of bitches, as well as the cell proliferation at specific moments of diestrus, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 days post-ovulation, correlating the endometrial thickness with the uterine cell proliferation and the metabolic state (weight, blood glucose and plasma cholesterol) of the animals. Therefore, the right and left uterine horns of 26 clinically healthy bitches submitted to ovariohysterectomy were histologically analyzed 10, 20, 30, 40, 50 and 60 days post-ovulation. The hematoxylin-eosin and AgNOR staining techniques were performed. All parameters were evaluated by the Shapiro-Wilk normality assumption and the samples subjected to ANOVA and post-hoc Tukey test ($p < 0.05$). The correlation between endometrial thickness and uterine cell proliferation, weight, blood glucose and plasma cholesterol of animals was observed using the Pearson method ($p < 0.05$). The software used was BioEstat® version 5.0. It was concluded that the endometrial thickness did not differ between post-ovulation days and was not correlated with the uterine cell proliferation, weight, blood glucose or serum cholesterol of the bitches. However, there was greater cell proliferation at 40 days post-ovulation compared to 60 days.

Key words: AgNOR; Dogs; Hematoxylin-eosin; Uterus.

LISTA DE SIGLAS

AgNOR: Argyrophilic Nuclear OrganizerRegions

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

dL: decilitro

E2: Estradiol

FSH: hormônio folículo-estimulante

Kg: Kilograma

LH: hormônio luteinizante

mL: mililitro

mg: micrograma

ng: Nanograma

NORs: regiões organizadoras de nucléolo

OSH: Ovariosalpingohisterectomia

P4: progesterona

pg: picograma

TVT:Tumor venéreo transmissível

µm: micrometro

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO PARA A REVISTA ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS.....	09
ANEXO 1 - NORMAS DA REVISTA ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS.....	28
ANEXO 2 - APROVAÇÃO PELA CEUA DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA.....	31
ANEXO 3 - COMPROVANTE DE ENVIO DO ARTIGO PARA A REVISTA ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS.....	32

ARTIGO CIENTÍFICO NAS NORMAS DA REVISTA ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS

1. Página de rosto

CARACTERIZAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DO ENDOMÉTRIO DE CADELAS EM FASE DE DIESTRO

Histologia do endométrio de cadelas no diestro

Seção: Ciências Agrárias

VANESSA DA SILVA ALVES **GOSSLER**¹; Francislaine Aneliza Garcia **Santos**¹; Aline Rosa de **Azevedo**¹; Priscila Carolina **Gonçalves**¹; Hugo Augusto **Rigolo**¹; Cleonice **Trevisan**¹; Ana Paula Batista **Masseno**¹; Ana Paula Mattoso MisKulin **Cardoso**¹; Paula de Carvalho **Papa**²; Caliê **Castilho**¹; InesCristina **Giometti**^{1*}.

1- Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Campus II, Rod. Raposo Tavares, Km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente (SP), CEP: 19067-175.

2- Universidade de São Paulo (USP), Av. Profº. Dr. Orlando Marques Paiva, 87, São Paulo (SP), CEP: 05508-270.

* inesgiometti@yahoo.com.br / fone: (18) 3229-2115.

Palavras-chave: AgNOR, cães, hematoxilina-eosina, útero.

2. Abstract

CHARACTERIZATION OF CELLULAR PROLIFERATION OF ENDOMETRIUM OF BITCHES IN DIESTRUS PHASE

This study aimed to determine the histological features of the endometrium of bitches, as well as the cell proliferation at specific moments of diestrus, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 days post-ovulation, correlating the endometrial thickness with the uterine cell proliferation and the metabolic state (weight, blood glucose and plasma cholesterol) of the animals. Therefore, the right and left uterine horns of 26 clinically healthy bitches submitted to ovariohysterectomy were histologically analyzed 10, 20, 30, 40, 50 and 60 days post-ovulation. The hematoxylin-eosin and AgNOR staining techniques were performed. All parameters were evaluated by the Shapiro-Wilk normality assumption and the samples subjected to ANOVA and post-hoc Tukey test ($p < 0.05$). The correlation between endometrial thickness and uterine cell proliferation, weight, blood glucose and plasma cholesterol of animals was observed using the Pearson method ($p < 0.05$). The software used was BioEstat® version 5.0. It was concluded that the endometrial thickness did not differ between post-ovulation days and was not correlated with the uterine cell proliferation, weight, blood glucose or serum cholesterol of the bitches. However, there was greater cell proliferation at 40 days post-ovulation compared to 60 days.

Keywords: AgNOR, dogs, hematoxylin-eosin, uterus

3. Introdução

As fases do ciclo estral canino são divididas em anestro, proestro, estro e diestro, sendo este ciclo controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, através da atuação das gonadotrofinas, hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) e dos hormônios esteroides, estradiol (E2) e progesterona (P4) (Concannon, 2009).

A cadela é considerada monoéstrica não sazonal com ovulações espontâneas. O proestro geralmente apresenta uma duração de 9 dias, no qual se observa os sinais externos causados pelo aumento do estrógeno, sendo estes sinais o edema da vulva e corrimento sanguinolento (Concannon, 2011). A concentração de FSH durante o proestro é reduzida gradativamente, concomitante a uma elevação nos níveis séricos de E2 que apresenta um pico no final do proestro e então declina rapidamente antes da onda de LH e do início do estro. O fim do proestro é caracterizado pelo aumento da concentração de P4 e redução do E2 (Concannon, 2009).

O estro tem duração variável de 5 a 10 dias, e caracteriza-se pela aceitação do macho pela fêmea. Neste período ocorre uma queda na concentração sérica de E2 e observa-se neste uma onda pré-ovulatória de FSH e LH, estimulada pelo E2, sendo que a onda de LH é um indício do início da ovulação. A concentração de P4 começa a aumentar antes da ovulação devido à luteinização dos folículos, em conjunto com o pico de LH (Concannon, 2011).

O final do comportamento característico do estro marca o início do diestro. A cadela apresenta um diestro bem característico da espécie, bem mais longo que outros animais, com duração de 55 a 75 dias em média de 60 dias (Concannon, 2011), por isso este período foi o de escolha para a realização deste estudo.

A fase de diestro na cadela é caracterizada pelo aumento de P4 na primeira metade e por flutuações de E2 na segunda metade. A maior capacidade do corpo lúteo em produção de P4 medida por concentrações no sangue periférico (30 a 35 ng/mL) ocorre entre os dias 15 e 25 pós-ovulação e depois diminui gradativamente para níveis de <1 ng/mL (Concannon, 1993; Hoffmann et al., 2004). O E2 apresenta concentrações variáveis e valores intermediários de 15 a 30 pg/mL, sendo mais elevado na metade do diestro, em torno do dia 40, declinando depois (Concannon, 2009; Papa and Hoffmann, 2011).

As alterações endócrinas demarcam momentos hormonais diferentes do diestro, bem caracterizadas por Fonseca et al. (2012), em que há uma concentração moderada de E2 e P4 aos 10 dias pós-ovulatório com aumento gradativo de ambos a partir desse

momento. Com consequente pico de P4 aos 20 dias e posterior declínio, caracterizando os 30 dias como um momento de ainda moderada produção de P4 e crescente E2. Aos 40 dias, observa-se a maior concentração de E2 do diestro, com decrescente nível de P4. Os 50 dias são marcados pela queda gradativa de E2 e de P4, culminando com baixas concentrações de ambos aos 60 dias. Não foram encontrados estudos na literatura que caracterizassem a espessura do endométrio e a proliferação celular do útero em cada um desses momentos de alteração hormonal do diestro.

O anestro é caracterizado pela queda da P4 para concentrações de 1 ou 2 ng/mL (Concannon, 2011). O anestro dura em média 18 a 20 semanas e é caracterizado pela ausência de atividade ovariana, sendo importante para a completa reparação do endométrio (Concannon, 2011).

Durante o ciclo estral, o endométrio da cadela sofre alterações morfológicas e bioquímicas que estão associadas com a proliferação, a apoptose e a diferenciação celular (Cruz, 2011). Apesar de alguns trabalhos em cadela relacionarem as alterações histológicas endometriais com momentos diferentes do ciclo (Cruz, 2011; Rehmet al., 2007) e com alterações patológicas ou induzidas por hormônios (Dhaliwalet al., 1999; Dhaliwalet al., 2002; Monteiro et al., 2009), não foram identificados trabalhos que relacionassem as fases específicas das principais alterações hormonais de E2 e P4 durante o diestro com as características morfofisiológicas do endométrio e sua proliferação celular.

O estudo da fisiologia do endométrio das cadelas no diestro contribui para a prevenção e tratamento de patologias relacionados ao endométrio e para evitar complicações em cirurgias de ovariossalpingohisterectomia (OSH), como por exemplo hemorragias.

O objetivo deste estudo foi determinar as características histológicas do endométrio de cadela, assim como a sua proliferação celular em momentos específicos do diestro nos dias 10, 20, 30, 40, 50 e 60 pós-ovulação, correlacionando a espessura do endométrio com a proliferação celular e o estado metabólico (peso, glicemia e colesterol) dos animais.

4. Materiais e métodos

Neste estudo foram analisados histologicamente os cornos uterinos direito e esquerdo de 26 cadelas clinicamente saudáveis, de diferentes idades e sem padrão racial definido. Os úteros (dois cornos uterinos) foram obtidos de cadelas que passaram por cirurgia eletiva de ovariossalpingohisterectomia (OSH) em clínica particular, aos 10 (n=10), 20 (n=8), 30 (n=8), 40 (n=8), 50 (n=8) e 60 dias (n=10) após a ovulação, constituindo

assim os seis grupos estudados neste experimento. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) Institucional (número do processo: 2265). Para saber o momento exato da ovulação, foi realizado um acompanhamento das cadelas anteriormente para que fosse definido o dia da cirurgia de OSH. O acompanhamento ocorreu por meio de colheitas de amostras de sangue seriadas, em dias alternados, para dosagem sérica de P4 após o início dos sinais de cio. O dia da ovulação (dia 0) foi definido como o dia em que a concentração da P4 periférica foi ≥ 5 ng/mL (Concannon et al., 1989).

O protocolo anestésico utilizado para a realização da OSH foi medicação pré-anestésica com acepromazina 0,05mg/kg etramadol 2mg/kg, via intramuscular, e posteriormente indução com cloridrato de cetamina 0,1mg/kg, diazepam 0,5mg/kg e propofol 3mg/kg, via intravenosa e manutenção isoflurano, via inalatória.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por meio de incisão suficiente para manipular os ovários e a cervix, na linha média ventral, caudalmente à cicatriz umbilical, expondo a cavidade abdominal. O corno uterino foi tracionado para o rompimento do ligamento suspensório, permitindo a exteriorização dos ovários. Após a ligadura dos pedículos ovarianos, transeccionou-se os pedículos para liberação dos ovários. O útero foi tracionado cranialmente e o corpo uterino foi suturado cranialmente à cervix, realizando-se a transecção do corpo uterino, o útero foi removido com tubas uterinas e ovários. Recolocou-se o coto uterino para dentro do abdômen, e a parede abdominal foi fechada em três camadas (fáscia/linha alba, tecido subcutâneo e pele).

No dia da OSH, as cadelas foram pesadas e foi colhido sangue por venopunção na veia cefálica em tubos sem anticoagulante para dosagens de colesterol e em tubos com EDTA e fluoreto de potássio para dosagem de glicose. No laboratório, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min. O colesterol total foi determinado no soro e o plasma foi utilizado para determinação da glicemia. As análises bioquímicas foram processadas por espectrofotometria, utilizando o sistema CobasC111[®] (Roche Diagnostics Ltda, Suíça), através de kits de ensaio colorimétrico-enzimáticos do mesmo fabricante do equipamento.

Os cornos uterinos foram colhidos e armazenados em solução de Davidson e 24 horas após, lavados em água corrente e depois colocados em álcool 75^o e nesta solução mantidos até a inclusão das amostras em parafina. Após a inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 5 μ m de espessura e as lâminas foram confeccionadas utilizando o micrótomo do setor de Patologia Animal do Hospital Veterinário da UNOESTE. Foram confeccionadas uma lâmina dos cornos uterinos direito e esquerdo de cada cadela e

estas foram submetidas à coloração de hematoxilina-eosina (HE). Posteriormente foram fotografadas por uma câmera acoplada ao microscópio de luz em objetiva de 4x. As espessuras dos endométrios das cadelas foram avaliadas utilizando a média de 20 medidas de altura de endométrio por lâmina utilizando o software MOTIC Imageplus 2.0[®] (Figura 2B).

Também foi realizada a coloração pelo método de AgNOR (“Argyrophilic Nuclear Organizer Regions”), onde foi confeccionada uma lâmina para os cornos direito e esquerdo de cada cadela. As lâminas foram desparafinadas e hidratadas em água deionizada e posteriormente colocadas em uma solução de gelatina a 2% e ácido fórmico a 1% em água deionizada e solução de nitrato de prata a 50%, na proporção de 1:2. As lâminas ficaram imersas nessa solução durante 45 minutos em estufa a 37°C. Após, foram lavadas em água deionizada por 1 minuto, desidratadas, clarificadas e montadas com resina sintética (Kravis et al., 1996; Simoes et al., 1994; Vajdovich et al., 2004). Para definir a área de AgNOR, as lâminas foram fotografadas por uma câmera acoplada ao microscópio de luz em objetiva de 100x com o auxílio do óleo de imersão. As áreas de regiões organizadoras nucleolares (NORs), coradas com nitrato de prata e visualizadas em tons marrom-acastanhados foram marcadas e quantificadas utilizando o software MOTIC Imageplus 2.0[®], em dez campos diferentes de cada lâmina, onde foram mensurados 10 núcleos em cada campo. Este método constitui um recurso para analisar a proliferação celular, uma vez que as estruturas coradas estão relacionadas com o nível de atividade celular e nuclear (Figura 2A). Nas células em proliferação, aumenta o número de NORs, tornando-se possível a relação entre a área de NORs e a proliferação celular (Crocker, 1996; Derenzini, 2000).

Todos os parâmetros foram avaliados pelo pressuposto de normalidade de Shapiro-Wilk, considerando dados normais quando $p > 0,01$. As amostras foram então submetidas a ANOVA seguida de Tukey ($p < 0,05$). A correlação entre espessura de endométrio e peso, glicemia e colesterol foi verificada pelo teste de Pearson ($p < 0,05$). O programa utilizado foi o BioEstat[®] versão 5.0.

5. Resultados e discussão

O diestro é o período do ciclo estral em que o endométrio atinge a sua maior espessura e densidade celular (Cruz, 2011; Rehm et al., 2007), e o início do diestro é a fase de maior espessura do endométrio (Cruz, 2011). No presente trabalho, somente o

diestro foi avaliado e não foram encontradas diferenças estatísticas na espessura do endométrio nos diferentes momentos do diestro, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a ovulação (Figura 1 e Figura 2B). Essa diferença entre os trabalhos é porque a primeira aferição do endométrio deste trabalho foi no dia 10 da ovulação e a diferença encontrada por Cruz (Cruz, 2011) foi nos dias iniciais do diestro, de 0 a 10 dias, período em que nenhuma das cadelas deste estudo se encontrava.

Figura 1: Média e erro padrão da espessura do endométrio (μm) dos cornos uterinos de cadelas dos diferentes grupos: aos 10 (n=10); 20 (n=8); 30 (n=8); 40 (n=8); 50 (n=6); e 60 dias pós-ovulação (n=10), $p > 0,05$.

Figura 2: Fotomicrografias: (A) regiões organizadoras de nucléolo (NORs) aos 10 dias pós-ovulação em aumento de 1000x; (B) medidas da espessura de endométrio de corno uterino em aumento de 40x; (C) edema aos 10 dias pós-ovulação em aumento de 100x. Coloração de prata (A) e coloração por hematoxilina-eosina (B e C).

Como a espessura do endométrio não apresentou diferença significativa entre os grupos, realizou-se uma análise de correlação entre a espessura do endométrio e o peso dos animais, glicemia e também com o colesterol plasmático. Pois havia a indagação se tais fatores estariam interferindo na espessura do endométrio dos animais, pois as cadelas eram de diferentes tamanhos sem um padrão de raça definido, e, apesar de terem escore corporal semelhante, de 3 a 6, seguindo o descrito para escore de cães por (Laflamme, 2006), não se tinha conhecimento se o estado metabólico poderia interferir no resultado das análises das espessuras endometriais. Nenhuma correlação foi encontrada entre o peso corporal dos animais, a glicemia ou o colesterol plasmático com a espessura do endométrio (Tabela 1).

Tabela 1: Coeficiente de correlação de Pearson (r) para associação entre a espessura de endométrio e peso corporal (n=24), glicemia (n=23), colesterol plasmático (n=23) de cadelas, média de área de regiões organizadoras de nucléolo - NORs (n=24) e número de NORs (n=24), dados estimados por ponto e por intervalo com 95% de confiança (IC95%) e significância estatística (p) do teste t, Presidente Prudente, 2014.

	Espessura de endométrio (μm)		
	r	IC 95%	p
Peso corpóreo (Kg)	0,1693	-0,25 a 0,54	0,4291
Glicemia (mg/dL)	-0,2026	-0,57 a 0,23	0,3537
Colesterol total (mg/dL)	0,1606	-0,27 a 0,54	0,4642
Área de NORs (μm^2)	-0,0181	-0,40 a 0,37	0,9301
Número de NORs	-0,2045	-0,55 a 0,20	0,3162

Sabe-se que cadelas com obesidade crônica podem apresentar níveis de colesterol e triglicérides aumentados (Jeusette et al., 2005) e diabetes mellitus, caracterizada pelo aumento da glicemia (Hoenig et al., 2002; Kim et al., 2003). A alimentação altamente calórica induz a resistência à insulina e diminuição da habilidade da insulina em transportar a glicose para o tecido periférico (Kim et al., 2003), levando a um aumento da secreção de insulina (Verwaerde et al., 1999), contribuindo para o desenvolvimento de intolerância à glicose (Kaiyala et al., 1999) e supressão da produção de glicose pelo fígado (Kim et al., 2003), predispondo os animais ao diabetes mellitus tipo 2 (Kaiyala et al., 1999; Kim et al., 2003). O estado metabólico do animal tem ação sobre a endocrinologia e a reprodução, por isso este estudo analisou a concentração de glicemia e de colesterol no momento da OSH. Porém, todos os animais do presente experimento eram normoglicêmicos e apresentaram concentração de colesterol sérico normal e esses dados não tiveram correlação com a espessura do endométrio.

Presumia-se que as diferentes concentrações hormonais aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias pudessem alterar a espessura do endométrio, mas isso não foi observado neste estudo. A fase de diestro na cadela é caracterizada pelo aumento de P4 na primeira metade e por flutuações de E2 na segunda metade. Durante a fase pré-ovulatória, o E2 atinge picos de concentrações bastante elevados, porém após a ovulação ocorre uma rápida queda desta concentração que torna a se elevar a partir do dia 25 pós-ovulação, com pico aos 45 dias (Fonseca et al., 2012). O E2 apresenta concentrações variáveis e valores intermediários de 15 a 30 pg/mL, encontrando-se em uma concentração de aproximadamente 12 pg/mL aos 10 dias pós-ovulação e se eleva até o dia 40, quando

começa a apresentar um declínio, retornando à concentração do dia 10 no dia 60 pós-ovulação (Concannon, 2009; Fonseca et al., 2012; Papa and Hoffmann, 2011).

As concentrações mais elevadas de P4 plasmática (30 a 35 ng/mL) são encontradas na primeira metade do diestro especialmente entre os 11 e 30 dias após a ovulação, com pico aos 20 dias pós-ovulação (Concannon, 1993; Cruz, 2011; Fonseca et al., 2012; Hoffmann et al., 2004). Aos 30 dias, a P4 se encontrava em uma concentração de 5ng/mL (igual ao dia 10 pós-ovulação) e continua em queda de concentração nos dias subsequentes, devido à regressão do corpo lúteo, até retornarem a valores basais (<0,5 ng/mL) no anestro (Cruz, 2011; Fonseca et al., 2012). Apesar destas alterações de concentrações plasmáticas hormonais bem marcadas nos dias analisados por este estudo, isto não foi refletido numa diferença na espessura do endométrio.

A produção de P4 de origem folicular se inicia no final do proestro antes da ovulação, atingindo níveis plasmáticos periféricos de aproximadamente 5ng/mL no momento da ovulação (Concannon et al., 1989).

A aparência histológica dos cortes transversais do útero no início do diestro foi similar ao descrito em outros trabalhos (Chandra and Adler, 2008; Cruz, 2011; Rehm et al., 2007) com uma rede densa de colágeno no estroma, o epitélio glandular cilíndrico com glândulas basais de aparência enrolada e os núcleos das células epiteliais das criptas fracamente basófilos. Em todas as cadelas aos 10 dias pós-ovulação foi verificado edema, discreto (n=4) ou intenso (n=1) com o lúmen hemorrágico. Somente uma delas não apresentou edema em ambos os cornos uterinos (Tabela 2). Esse resultado condiz com o descrito na literatura que no início do diestro ainda há edema característico do proestro e estro e que vai reduzindo com o avanço da fase de diestro (Chandra and Adler, 2008; Rehm et al., 2007). Nos outros períodos avaliados, a porcentagem de cornos que apresentaram edema foi bem inferior aos do grupo 10 dias pós-ovulação. Diante disso, podemos supor que a maior porcentagem de cornos uterinos com presença de edema no grupo avaliado aos 10 dias após ovulação se deve à proximidade deste período com o período de estro. Nenhuma cadela apresentou edema dos 40 aos 60 dias pós-ovulação. Portanto, o melhor período para realização de OSH em cadelas é do meio do diestro em diante, uma vez que a ocorrência de edema nos cornos uterinos é menor assim como a vascularização sanguínea, diminuindo o risco de hemorragia às pacientes.

Tabela 2: Classificações de alterações morfológicas encontradas no endométrio das cadelas aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias pós-ovulação. Os valores apresentados correspondem ao valor numérico (porcentagem) de cornos uterinos em que foram encontradas alterações morfológicas na histologia corada por hematoxilina-eosina.

Grupos	Alterações morfológicas		
	Edema	Lúmen hemorrágico	Infiltrado inflamatório
10 dias (n=10)	9 (90%)	2 (20%)	0
20 dias (n=8)	2 (25%)	0	0
30 dias (n=8)	2 (25%)	1(12,5%)	0
40 dias (n=8)	0	0	0
50 dias (n=7)	0	0	0
60 dias (n=10)	0	0	0

Análise em frequência das alterações, não foi realizada análise estatística.

Quanto à proliferação celular analisada através do número de NORs (regiões organizadoras de nucléolo), os resultados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) nas cadelas ovariossalpingohisterectomizadas aos 40 e 60 dias após ovulação, sendo que aos 40 dias após ovulação houve a maior proliferação celular e aos 60 dias após ovulação foi o período onde proliferação celular foi menor em relação aos demais períodos estudados. Não houve correlação entre o número de NORs e espessura de endométrio das cadelas ($p > 0,05$), resultados apresentados na tabela 1.

Figura 3: Área média e erro padrão das regiões organizadoras de nucléolo (NORs), áreas maiores são indicativas de menor proliferação celular do endométrio dos cornos de cadelas aos 10 (n=10), 20 (n=7), 30 (n=8), 40 (n=8), 50 (n=6) e 60 (n=9) dias pós-ovulação. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 4: Número médio e erro padrão de regiões organizadoras de nucléolo (NORs), números maiores de NORs são indicativos de maior proliferação celular do endométrio dos cornos de cadelas aos 10 (n=10), 20 (n=7), 30 (n=8), 40 (n=8), 50 (n=6) e 60 (n=9) dias pós-ovulação. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 5: Médias e erro padrão da razão entre as áreas totais dos núcleos celulares pelas áreas totais das regiões organizadoras de nucléolo (NORs), quocientes maiores são indicativas de maior proliferação celular do endométrio dos cornos de cadelas aos 10 (n=10), 20 (n=7), 30 (n=8), 40 (n=8), 50 (n=6) e 60 (n=9) dias pós-ovulação. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

O número e a área das NORs representam parâmetros que refletem o grau da atividade proliferativa das células (Santos et al., 2011), onde em estudo com tumor venéreo transmissível (TVT) canino demonstraram que quanto maior o número de pequenas NORs, maior era a atividade proliferativa da célula, com tumores na fase de crescimento apresentando maior número médio de NORs no interior do núcleo comparado os TVTs regressivos.

Em um estudo com células da granulosa de folículos secundários de ratas, Silva et al (Silva et al., 2003) observaram que nos folículos secundários com duas a três camadas de células da granulosa, as NORs eram grandes e estavam presentes em pequeno número. Nos folículos secundários mais desenvolvidos, com maior proliferação celular, as células da granulosa apresentavam NORs predominantemente pequenas, dispersas por todo o núcleo e em número significativamente maior, demonstrando assim que NORs com maior área e em menor quantidade indicam menor proliferação celular, enquanto que NORs menores e em maior quantidade indicam maior proliferação celular.

Sendo o E2 o responsável pela proliferação celular nas células do endométrio (Van Cruchten et al., 2004), podemos sugerir uma correlação positiva entre os níveis de E2 e a proliferação celular pois nos períodos em que ocorreu a maior proliferação, aos 40 dias após ovulação, também é o período onde ocorre a maior produção de E2 (Concannon, 2009; Fonseca et al., 2012; Papa and Hoffmann, 2011). Entretanto, no período em que ocorreu a menor proliferação, aos 60 dias após ovulação, é sabido que ocorre a menor produção de E2 de todos os períodos do diestro. Van Cruchten (Van Cruchten et al., 2004) descreveram resultados semelhantes em seu estudo, onde a proliferação celular no epitélio superficial, estroma, vasos sanguíneos e criptas foram positivamente correlacionados com os níveis de E2.

Um aumento do número de células epiteliais em proliferação foi observado em culturas de células endometriais tratadas com estradiol assim como foi verificado através de análise imunohistoquímica dos receptores de estrogênio maior expressão destes receptores nas culturas estimuladas pelo E2 associada ao maior número de células em proliferação (Cruz, 2011; Vermeirsch et al., 1999).

Conclui-se no presente trabalho que a espessura do endométrio não difere entre os dias pós-ovulação e que não tem correlação com o peso, glicemia ou o colesterol sérico das cadelas. Porém, há uma maior proliferação celular aos 40 dias pós-ovulação em relação aos 60 dias.

6. Agradecimentos

À Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) pelo apoio financeiro na forma de materiais e de bolsas PROBIC de Iniciação Científica e também por todo o suporte estrutural concedido durante o experimento.

Agradeço também à Ma. Ana Paula Mattoso MisKulinCardoso por ceder o material para esta pesquisa.

7. Resumo

CARACTERIZAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DO ENDOMÉTRIO DE CADELAS EM FASE DE DIESTRO

O presente estudo teve o objetivo de determinar as características histológicas do endométrio de cadela, assim como a sua proliferação em momentos específicos do diestro nos dias 10, 20, 30, 40, 50 e 60 pós-ovulação, correlacionando a espessura do endométrio com o peso, glicemia e colesterol das cadelas. Para tanto, foram analisados histologicamente os cornos uterinos direito e esquerdo de 26 cadelas clinicamente sadias ovariohisterectomizadas aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a ovulação. Foram realizadas a coloração de hematoxilina-eosinae também a coloração pelo método de AgNOR. Todos os parâmetros foram avaliados pelo pressuposto de normalidade de Shapiro-Wilk e as amostras submetidas a ANOVA seguida de Tukey ($p < 0,05$). A correlação entre espessura de endométrio e peso, glicemia e colesterol plasmático foi verificada pelo método de Pearson ($p < 0,05$). O programa utilizado foi o BioEstat[®] versão 5.0. Conclui-se que a espessura do endométrio não difere entre os dias pós-ovulação e que não tem correlação com o peso, glicemia ou o colesterol sérico das cadelas. Porém, há uma maior proliferação celular aos 40 dias pós-ovulação em relação aos 60 dias.

Palavras-chave: AgNOR, cães, hematoxilina-eosina, útero.

8. Referências

- Chandra SA and Adler RR. 2008. Frequency of different estrous stages in purpose-bred beagles: a retrospective study. *Toxicol Pathol*36: 944–949.
- Concannon PW. 1993. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J Reprod Fertil Suppl*47: 3–27.
- Concannon PW. 2009. Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reprod Domest Anim*44: 3–15.
- Concannon PW. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci* 124: 200–210.
- Concannon PW, McCann JP and Temple M. 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fertil Suppl* 39: 3–25.
- Crocker J. 1996. Molecular and biochemical aspects of interphase nucleolar organiser regions. *Clin Mol Pathol*49: M8–M11.
- Cruz SA da F. 2011. Proliferação e apoptose celular no endométrio da cadela. *Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 71p.*
- Derenzini M. 2000. The AgNORs. *Micron*31: 117–120.
- Dhaliwal GK, England GCW and Noakes DE. 1999. The influence of exogenous steroid hormones on steroid receptors, uterine histological structure and the bacterial flora of the normal bitch. *Anim Reprod Sci* 56: 259-277.
- Dhaliwal GK, England GCW and Noakes, DE. 2002. The effects of endometrial scarification on uterine steroid receptors, bacterial flora and histological structure in the bitch. *Anim Reprod Sci* 69: 239-249.
- Fonseca VU, Papa PC and Campos DB. 2012. Potencial envolvimento da adiponectina e seus receptores na modulação da esteroidogênese em corpo lúteo de cadelas ao longo do diestro. *Pesq Vet Bras* 32: 1055–1060.
- Hoenig M, Alexander S, Holson J and Ferguson DC. 2002. Influence of glucose dosage on interpretation of intravenous glucose tolerance tests in lean and obese cats. *J Vet Intern Med* 16: 529-32.
- Hoffmann B, Büsges F, Engel E, Kowalewski MP and Papa P. 2004. Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reprod Domest Anim* 39: 232–240.
- Jeusette IC, Lhoest ET, Istasse LP and Diez MO. 2005. Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentrations in dogs. *Am JVet Res* 66: 81–86.
- Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Porte D and Schwartz MW. 1999. Reduced beta-cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese by high-fat feeding. *Am J Physiol* 277: E659–E667.

Kim SP, Ellmerer M, Van Citters GW and Bergman RN. 2003. Primacy of Hepatic Insulin Resistance in the Development of the Metabolic Syndrome Induced by an Isocaloric Moderate-Fat Diet in the Dog. *Diabetes* 52: 2453–2460.

Kravis LD, Vail DM, Kisseberth WC, Ogilvie GK and Volk LM. 1996. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 209: 1418–1420.

Laflamme DP. 2006. Understanding and Managing Obesity in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice, Vet Clin North Am Small Anim Pract* 36: 1283–1295.

Monteiro CMR, Perri SHV, Carvalho RG and Koivisto MB. 2009. Histologia e morfometria em cornos uterinos de cadelas nulíparas, múltiparas e tratadas com contraceptivos. *PesqVetBras* 29: 847-851.

Papa PC and Hoffmann B. 2011. The Corpus Luteum of the Dog: Source and Target of Steroid Hormones? *Reprod Domest Anim* 46: 750–756.

Rehm S, Stanislaus DJ and Williams AM. 2007. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 80: 233–245.

Santos FGA, Moro L, Cassali GD, Paixão TA, Campos PP, Silva SS and Vasconcelos AC. 2011. Cell proliferation markers in the transplanted canine transmissible venereal tumor. *Arq Bras Med Vet Zootec* 63: 1345–1352.

Silva CM, Serakides R, Nascimento EF, Nunes VA, Ribeiro AFC and Ocarina NM. 2003. Quantificação das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) como parâmetro para avaliar a proliferação das células da granulosa. *Arq Bras Med Vet Zootec* 55: 113–116.

Simoens JPC, Schoning P and Butine M. 1994. Prognosis of Canine Mast Cell Tumors: A Comparison of Three Methods. *Vet Pathol* 31: 637–647.

Vajdovich P, Psáder R, Tóth ZA and Perge E. 2004. Use of the argyrophilic nucleolar region method for cytologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs. *Vet Pathol* 41: 338–345.

Van Cruchten S, Van Den Broeck W, D'Haeseleer M and Simoens P. 2004. Proliferation patterns in the canine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology* 62: 631–641.

Vermeirsch H, Simoens P, Lauwers H and Coryn M. 1999. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. *Theriogenology* 51: 729–743.

Verwaerde P, Sénard JM, Galinier M, Rougé P, Massabuau P, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M and Montastruc JL. 1999. Changes in short-term variability of blood pressure and heart rate during the development of obesity-associated hypertension in high-fat fed dogs. *J Hypertens* 17: 1135–1143.

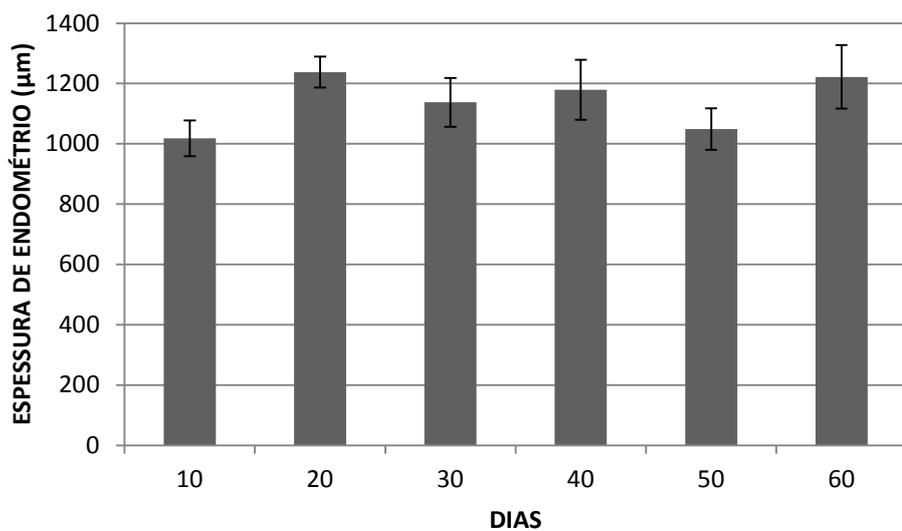


Figura 1:Média e erro padrão da espessura do endométrio (µm) dos cornos uterinos de cadelas dos diferentes grupos: aos 10 (n=10); 20 (n=8); 30 (n=8); 40 (n=8); 50 (n=6); e 60 dias pós-ovula o (n=10), $p > 0,05$.

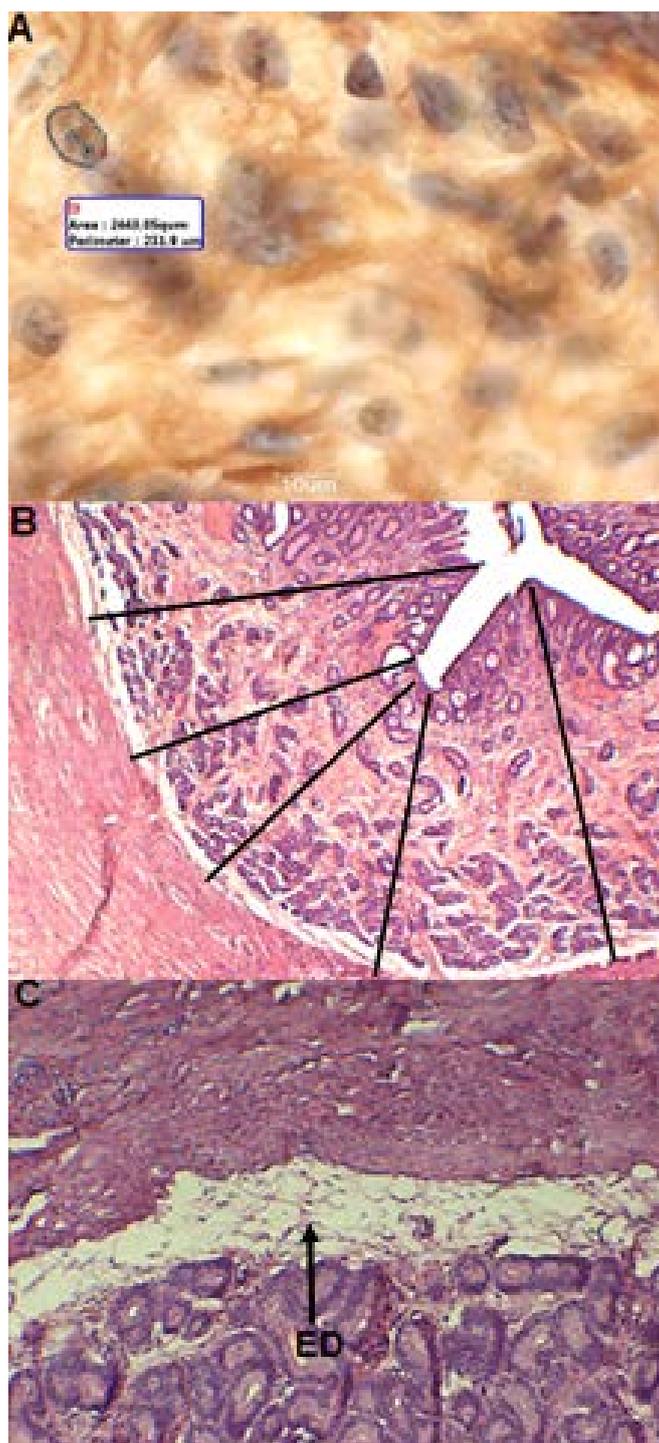


Figura 2: Fotomicrografias: (A) regiões organizadoras de nucléolo (NORs) aos 10 dias pós-ovulação em aumento de 1000x;(B) medidas da espessura de endométrio de corno uterino em aumento de 40x; (C) edema aos 10 dias pós-ovulação em aumento de 100x. Coloração de prata (A) e coloração por hematoxilina-eosina (B e C).

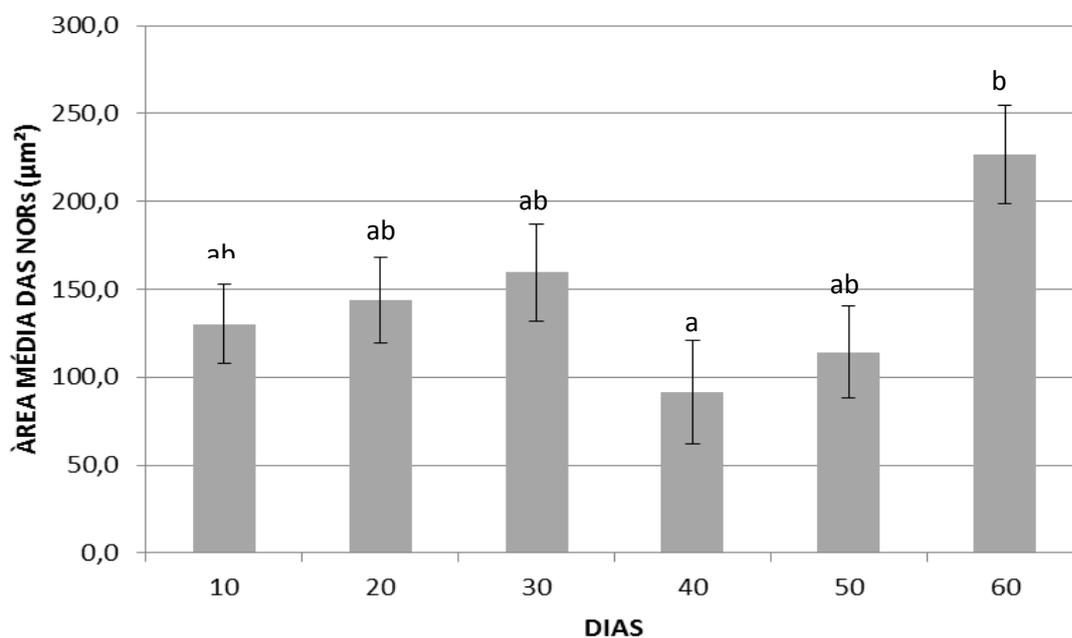


Figura 3: Área média e erro padrão das regiões organizadoras de nucléolo (NORs), áreas maiores são indicativas de menor proliferação celular do endométrio dos cornos de cadelas aos 10 (n=10), 20 (n=7), 30 (n=8), 40 (n=8), 50 (n=6) e 60 (n=9) dias pós-ovulação. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

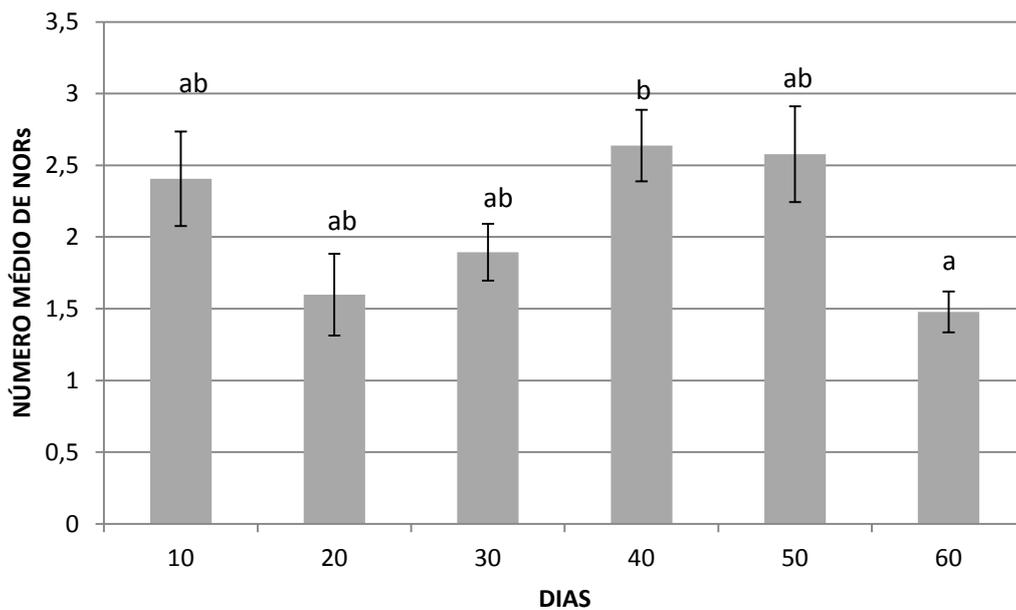


Figura 4: Número médio e erro padrão de regiões organizadoras de nucléolo (NORs), números maiores de NORs são indicativos de maior proliferação celular do endométrio dos cornos de cadelas aos 10 (n=10), 20 (n=7), 30 (n=8), 40 (n=8), 50 (n=6) e 60 (n=9) dias pós-ovulação. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

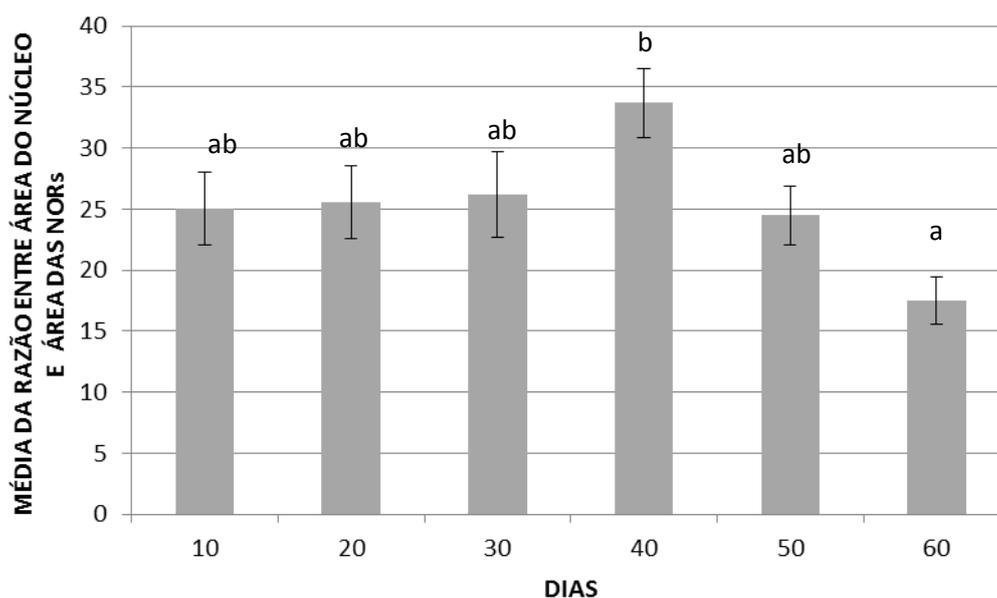


Figura 5: Médias e erro padrão da razão entre as áreas totais dos núcleos celulares pelas áreas totais das regiões organizadoras de nucléolo (NORs), quocientes maiores são indicativas de maior proliferação celular do endométrio dos cornos de cadelas aos 10 (n=10), 20 (n=7), 30 (n=8), 40 (n=8), 50 (n=6) e 60 (n=9) dias pós-ovulação. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

ANEXO1 - NORMAS DA REVISTA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS



Instruções aos Autores

Revisadas em dezembro de 2007

A revista ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS encoraja fortemente as submissões online. Uma vez o artigo preparado de acordo com as instruções abaixo, visite o site de submissão online (<http://aabc.abc.org.br/>).

As instruções devem ser lidas cuidadosamente e seguidas integralmente. Desta forma, a avaliação e publicação de seu artigo poderão ser feitas com mais eficiência e rapidez. Os editores reservam-se o direito de devolver artigos que não estejam de acordo com estas instruções. Os artigos devem ser escritos em inglês claro e conciso.

Objetivo e Política Editorial

Todos os artigos submetidos devem conter pesquisa original e ainda não publicada ou submetida para publicação. O primeiro critério para aceitação é a qualidade científica. O uso excessivo de abreviaturas ou jargões deve ser evitado, e os artigos devem ser compreensíveis para uma audiência tão vasta quanto possível. Atenção especial deve ser dada ao Abstract, Introdução e Discussão, que devem nitidamente chamar a atenção para a novidade e importância dos dados relatados. A não observância desta recomendação poderá resultar em demora na publicação ou na recusa do artigo.

Os textos podem ser publicados como uma revisão, um artigo ou como uma breve comunicação. A revista é trimestral, sendo publicada nos meses de março, junho, setembro e dezembro.

Tipos de Artigos

Revisões: Revisões são publicadas somente a convite. Entretanto, uma revisão pode ser submetida na forma de breve carta ao Editor a qualquer tempo. A carta deve informar os tópicos e autores da revisão proposta e declarar a razão do interesse particular do assunto para a área.

Artigos: Sempre que possível, os artigos devem ser subdivididos nas seguintes partes: 1. Página de rosto; 2. Abstract (escrito em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações); 3. Introdução; 4. Materiais e Métodos; 5. Resultados; 6. Discussão; 7. Agradecimentos quando necessário; 8. Resumo e palavras-chave (em português - os autores estrangeiros receberão assistência); 9. Referências. Artigos de algumas áreas, como Ciências Matemáticas, devem observar seu formato usual. Em certos casos pode ser aconselhável omitir a parte (4) e reunir as partes (5) e (6). Onde se aplicar, a parte de Materiais e Métodos deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em humanos ou as normas seguidas para a manutenção e os tratamentos experimentais em animais.

Breves Comunicações: Breves comunicações devem ser enviadas em espaço duplo. Depois da aprovação não serão permitidas alterações no artigo, a fim de que somente correções de erros tipográficos sejam feitas nas provas.

Os autores devem enviar seus artigos somente em versão eletrônica.

Preparo dos Artigos

Os artigos devem ser preparados em espaço duplo. Depois de aceitos nenhuma modificação será realizada, para que nas provas haja somente correção de erros tipográficos.

Tamanho dos artigos: Embora os artigos possam ter o tamanho necessário para a apresentação concisa e discussão dos dados, artigos sucintos e cuidadosamente preparados têm preferência tanto em termos de impacto quando na sua facilidade de leitura.

Tabelas e ilustrações: Somente ilustrações de alta qualidade serão aceitas. Todas as ilustrações serão consideradas como figuras, inclusive desenhos, gráficos, mapas, fotografias e tabelas com mais de 12 colunas ou mais de 24 linhas (máximo de figuras gratuitas: cinco figuras). A localização provável das figuras no artigo deve ser indicada.

Figuras digitalizadas: As figuras devem ser enviadas de acordo com as seguintes especificações: 1. Desenhos e ilustrações devem ser em formato .PS/.EPS ou .CDR (Postscript ou Corel Draw) e nunca inseridas no texto; 2. Imagens ou figuras em meio tom devem ser no formato .TIF e nunca inseridas no texto; 3. Cada figura deve ser enviada em arquivo separado; 4. Em princípio, as figuras devem ser submetidas no tamanho em que devem aparecer na revista, i.e., largura de 8 cm (uma coluna) ou 12,6 cm (duas colunas) e com altura máxima para cada figura menor ou igual a 22 cm. As legendas das figuras devem ser enviadas em espaço duplo e em folha separada. Cada dimensão linear das menores letras e símbolos não deve ser menor que 2 mm depois da redução. Somente figuras em preto e branco serão aceitas. 5. Artigos de Matemática, Física ou Química podem ser digitados em Tex, AMS-Tex ou Latex; 6. Artigos sem fórmulas matemáticas podem ser enviados em .RTF ou em WORD para Windows.

Página de rosto: A página de rosto deve conter os seguintes itens: 1. Título do artigo (o título deve ser curto, específico e informativo); 2. Nome (s) completo (s) do (s) autor (es); 3. Endereço profissional de cada autor; 4. Palavras-chave (4 a 6 palavras, em ordem alfabética); 5. Título abreviado (até 50 letras); 6. Seção da Academia na qual se enquadra o artigo; 7. Indicação do nome, endereço, números de fax, telefone e endereço eletrônico do autor a quem deve ser endereçada toda correspondência e prova do artigo.

Agradecimentos: Devem ser inseridos no final do texto. Agradecimentos pessoais devem preceder os agradecimentos a instituições ou agências. Notas de rodapé devem ser evitadas; quando necessário, devem ser numeradas. Agradecimentos a auxílios ou bolsas, assim como agradecimentos à colaboração de colegas, bem como menção à origem de um artigo (e.g. teses) devem ser indicados nesta seção.

Abreviaturas: As abreviaturas devem ser definidas em sua primeira ocorrência no texto, exceto no caso de abreviaturas padrão e oficial. Unidades e seus símbolos devem estar de acordo com os aprovados pela ABNT ou pelo Bureau International des Poids et Mesures (SI).

Referências: Os autores são responsáveis pela exatidão das referências. Artigos publicados e aceitos para publicação (no prelo) podem ser incluídos. Comunicações pessoais devem ser autorizadas por escrito pelas pessoas envolvidas. Referências a teses, abstracts de reuniões, simpósios (não publicados em revistas indexadas) e artigos em preparo ou submetidos mas ainda não aceitos, podem ser citados no texto como (Smith et al. unpublished data) e não devem ser incluídos na lista de referências.

As referências devem ser citadas no texto como, por exemplo, (Smith 2004), (Smith and Wesson 2005) ou, para três ou mais autores, (Smith et al. 2006). Dois ou mais artigos do mesmo autor no mesmo ano devem ser distinguidos por letras, e.g. (Smith 2004a), (Smith 2004b) etc. Artigos com três ou mais autores com o mesmo primeiro autor e ano de publicação também devem ser distinguidos por letras.

As referências devem ser listadas em ordem alfabética do primeiro autor sempre na ordem do sobrenome XY no qual X e Y são as iniciais. Se houver mais de 10 autores, use o primeiro seguido de et al. As referências devem ter o nome do artigo. Os nomes das revistas devem ser abreviados. Para as abreviações corretas, consultar a listagem de base de dados na qual a revista é indexada ou consulte a World List of Scientific Periodicals. A abreviatura para os Anais da Academia Brasileira de Ciências é An Acad Bras Cienc. Os seguintes exemplos são considerados como guia geral para as referências.

Artigos

Albe-Fessard D, Condes-Lara M, Sanderson P and Levante A . 1984a. Tentative explanation of the special role played by the áreas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Delandsheer E, Giuffrida R and Cesaro P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

Knowles RG and Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

Pinto ID and Sanguinetti YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

Livros e capítulos de livro

Davies M. 1947. An outline of the development of Science, *Athinker's Library*, n. 120. London: Watts, 214 p.

Prehn RT . 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: *National Cancer Conference* , 5., Philadelphia Proceedings, Philadelphia: J.B. Lippincott, p. 97-104.

Uytenbogaardt W and Burke EAJ . 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2 nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

Woody RW . 1974. Studies of theoretical circular dichroism of Polipeptides: contributions of B-turns. In: Blouts ER et al . (Eds), *Peptides, polypeptides and proteins*, New York: J Wiley and Sons, New York, USA, p. 338-350.

Outras publicações

International Kimberlite Conference , 5, 1991. Araxá, Brazil. Proceedings ... Rio de Janeiro: CPRM, 1994., 495 p.

Siatycki J . 1985. Dynamics of Classical Fields. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 19985, 55 p. Preprint n. 600.

ANEXO 2 - APROVAÇÃO PELA CEUA DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA

Certificado

Página 1 de 1

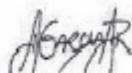
UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica**Parecer Final**

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E ESPESSURA DO ENDOMÉTRIO DE CADELAS EM DIFERENTES PERÍODOS DO DIESTRO.", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº 2265 e tendo como participante(s) INES CRISTINA GIOMETTI (responsável), CALJE CASTILHO SILVESTRE (docente), ANA PAULA BATISTA MASSENO (docente), ANA PAULA MATTOSO MISKULIN CARDOSO (docente), ALINE ROSA DE AZEVEDO (discente), HUGO AUGUSTO RIGOLO (discente), PRISCILA CAROLINA GONCALVES (discente), VANESSA DA SILVA ALVES GOSSLER (discente), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 13 de Agosto de 2015.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq

Prof. Ms. Adriana Falco de Brito

ANEXO 3 - COMPROVANTE DE ENVIO DO ARTIGO PARA A REVISTA ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS

8/14/2015

ScholarOne Manuscripts



Anais da Academia Brasileira de Ciências

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Anais da Academia Brasileira de Ciências*.

Manuscript ID: AABC-2015-0611

Title: CARACTERIZAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DO ENDOMÉTRIO DE CADELAS EM FASE DE DIESTRO

Authors: Gossler, Vanessa
Santos, Francislaine
Azevedo, Aline
Gonçalves, Priscila
Rigolo, Hugo
Trevisan, Cleonice
Masseno, Ana Paula
Cardoso, Ana
Papa, Paula
Giometti, Ines

Date Submitted: 14-Aug-2015

 Print  Return to Dashboard