



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**LARISSA RODRIGUES SANTANA**

**EFEITO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA NA  
EXPRESSÃO DE MEDIADORES HORMONAIIS NO ÚTERO  
DE CADELAS TRATADAS PARA PSEUDOGESTAÇÃO**

**ILHÉUS-BAHIA**  
**2021**

**LARISSA RODRIGUES SANTANA**

**EFEITO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA NA  
EXPRESSÃO DE MEDIADORES HORMONAIS NO ÚTERO  
DE CADELAS TRATADAS PARA PSEUDOGESTAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual  
de Santa Cruz, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Produção e Comportamento  
Animal

Sub-área da Dissertação: Reprodução Animal

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Paola Pereira das Neves  
Snoeck

Co-orientador: Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Juneo Freitas Silva

**ILHÉUS-BAHIA  
2021**

DISS  
S232

Santana, Larissa Rodrigues.

Efeito do cloridrato de piridoxina na expressão de mediadores hormonais no útero de cadelas tratadas para pseudogestação / Larissa Rodrigues Santana . – Ilhéus, BA: UESC, 2021.

79f. : il.; anexo.

Orientadora: Paola Pereira das Neves Snoeck  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA.

Inclui referências.

1. Cães. 2. Genes supressores de tumor. 3. Progesterona. 4. Pseudociese. 5. Vitamina B6. I. Título.

CDD 636.7

**LARISSA RODRIGUES SANTANA**

**EFEITO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA NA EXPRESSÃO DE MEDIADORES  
HORMONAIS NO ÚTERO DE CADELAS TRATADAS PARA PSEUDOGESTAÇÃO**

Ilhéus-BA, 25/02/2021

---

Paola Pereira das Neves Snoeck – DSc UESC/DCAA  
(Orientador)

---

Juneo Freitas Silva – DSc UESC/DCAA  
(Co-Orientador)

---

Renata Santiago Alberto Carlos – DSc UESC/DCAA

---

Marcelo Rezende Luz – DSc UFMG/DCCV

**ILHÉUS-BAHIA  
2021**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser a força maior que rege minha vida, me guiando e dando forças em todos os momentos.

A minha família, em especial minha mãe Simone, por ser o meu porto seguro, sempre de prontidão para dar incentivos e bons conselhos. Ao meu pai Jailton, por apoiar meu objetivo. Aos meus avós Nilza e William, que sempre acreditaram na força dos estudos e por todo carinho que sentem por mim. A minha prima Laís, que enfrentou o mestrado junto comigo e passou por todas de alegria e tristeza de uma pós-graduação. Foi meu ombro amigo, presente nas horas de estudos de estudos, nas renúncias de finais de semana, mas vencemos. A minha irmã, que mesmo longe esteve comigo nessa caminhada, comemorando cada progresso. Aos tios e primos, pela paciência e que compreenderam minhas ausências em certos momentos, mas sempre tinham palavras de motivação. Sou grata a cada um de vocês.

A minha orientadora, Paola Snoeck, primeiramente pela confiança e pela oportunidade em buscar conhecimento sobre a reprodução animal desde a época de iniciação científica, pelos conselhos, por toda a paciência, pelos ensinamentos sobre a vida acadêmica, por incentivar e dar sempre o melhor naquilo que faz, é para mim uma fonte de inspiração e determinação.

Ao meu co-orientador Juneo Silva, por ser tão solícito e por transmitir tantos conhecimentos durante todo esse período, por toda paciência durante a fase experimental, agradeço imensamente pela orientação. É um grande exemplo de profissional.

Ao meu colega de equipe William Moraes Machado, uma pessoa incrível sempre a postos para ajudar. Foi de grande importância sua participação nesse processo. Obrigada pelas horas de estudo, por todos os artigos lidos, pelas palavras que mesmo duras eram sinceras, pela companhia dos trabalhos desenvolvidos. Sou muita grata por sua amizade. A minha outra colega de equipe Maíra Kersul, por ser parceira de disciplinas e seminários e por ter enfrentado esses momentos junto comigo.

Agradeço de forma muito especial aos meus colegas Raquel Viera Niella e Luciano Cardoso, por ser meu ponto de apoio desde o primeiro ano do mestrado, pelos estudos nas provas de estatística, as avaliações dos seminários e as horas incomputáveis de padronização da nossa amada imunohistoquímica. Com certeza vocês tornaram tudo isso mais leve. Serei eternamente grata por tudo que aprendi.

Agradeço aos funcionários do Hospital Veterinário da UESC, em especial Ivo do Laboratório de Patologia Animal, por sua disponibilidade em ajudar com a confecção de lâminas e a Jamile, do Centro de Microscopia Eletrônica, auxiliando na utilização de equipamentos e preparo de reagentes.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz pela oportunidade em desenvolver a pesquisa e a FAPESB pelo financiamento de bolsa de estudo.

# EFEITO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA NA EXPRESSÃO DE MEDIADORES HORMONAIS NO ÚTERO DE CADELAS TRATADAS PARA PSEUDOGESTAÇÃO

## RESUMO

A descoberta do cloridrato de piridoxina (Vitamina B6) como tratamento para pseudogestação em cadelas demonstrou ser uma alternativa segura e eficaz. No entanto, até o momento não existem trabalhos sobre a expressão de mediadores hormonais no útero de cadelas pseudogestante tratadas. Dessa forma, avaliamos o efeito do cloridrato de piridoxina e cabergolina na histomorfometria e imunomarcção uterina dos receptores para progesterona, estrógeno, andrógeno, hormônio tireoidiano e sistema kisspeptina/Kiss1R. A prolactina sérica foi dosada para controle da hiperprolactinemia e foi observado redução nas concentrações séricas nas cadelas tratadas com de cloridrato de piridoxina 50mg/kg e cabergolina 5µg/kg para pseudogestação, apresentando semelhante eficácia ( $P > 0,05$ ) e diferindo-se ( $P < 0,05$ ) do grupo controle. Avaliou-se a imunomarcção no epitélio luminal uterino, ductos glandulares, glândulas profundas, estroma e miométrio. O útero de cadelas apresentou forte imunomarcção de PR em todos os tipos celulares e grupos estudados ( $P > 0,05$ ). Em contraste, os receptores ER $\alpha$  e Kiss1R apresentaram imunomarcção fraca a nula em todas as regiões uterinas sem diferença entre os grupos estudados ( $P > 0,05$ ). No útero de cadelas tratadas com vitamina B6, houve aumento de imunomarcção de AR nos ductos glandulares ( $P < 0,05$ ) e redução na imunomarcção de TR $\alpha$  no epitélio superficial ( $P < 0,05$ ). A análise histomorfométrica constituiu de mensurações da altura do epitélio luminal, epitélio glandular, espessura do miométrio, endométrio e número de glândulas endometriais, não sendo verificada diferença entre as cadelas pseudogestantes e tratadas ( $P > 0,05$ ). Concluiu-se que o cloridrato de piridoxina e cabergolina tiveram efeito local ou modularam a expressão de receptores de andrógeno e hormônio tireoidiano no útero de cadelas.

**Palavras-chave:** *Canis familiaris*; kisspeptina; progesterona; pseudociese; vitamina B6.

# EFFECT OF PYRIDOXINE HYDROCHLORIDE ON THE EXPRESSION OF HORMONE MEDIATORS IN THE UTERUS OF BITCHES TREATED FOR PSEUDOGESTATION

## ABSTRACT

The discovery of pyridoxine hydrochloride (Vitamin B6) as a treatment for pseudopregnancy in bitches proved to be a safe and effective alternative. However, to date, there are no studies on the expression of hormonal mediators in the uterus of treated pseudopregnant bitches. Thus, we evaluated the effect of pyridoxine hydrochloride and cabergoline on uterine histomorphometry and immunostaining of receptors for progesterone, estrogen, androgen, thyroid hormone and kisspeptin/Kiss1R system. Serum prolactin was measured to control hyperprolactinemia and a reduction in serum concentrations was observed in bitches treated with pyridoxine hydrochloride 50mg/kg and cabergoline 5µg/kg for pseudopregnancy, showing similar efficacy ( $P > 0.05$ ) and differing ( $P < 0.05$ ) of the control group. Immunostaining was evaluated in the uterine luminal epithelium, glandular ducts, deep glands, stroma and myometrium. The uterus of bitches showed strong PR immunostaining in all cell types and groups studied ( $P > 0.05$ ). In contrast, ER $\alpha$  and Kiss1R receptors showed weak to null immunostaining in all uterine regions with no difference between the studied groups ( $P > 0.05$ ). In the uterus of bitches treated with vitamin B6, there was an increase in AR immunostaining in the glandular ducts ( $P < 0.05$ ) and a reduction in TR $\alpha$  immunostaining in the surface epithelium ( $P < 0.05$ ). The histomorphometric analysis consisted of measurements of the height of the luminal epithelium, glandular epithelium, thickness of the myometrium, endometrium and number of endometrial glands, with no difference between the pseudopregnant and treated bitches ( $P > 0.05$ ). pyridoxine hydrochloride and cabergoline had a local effect or modulate the expression of androgen and thyroid hormone receptors in the uterus of bitches.

**Keywords:** *Canis familiaris*; kisspeptin; progesterone; pseudocyesis; vitamin B6.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Fotomicrografia de histologia uterina. Endométrio, SE= superfície epitelial; DG= ducto glandular (Coloração: hematoxilina e eosina; Barra = 50 µm). Fonte: Arquivo pessoal.....	17
<b>Figura 2 -</b>	Fotomicrografia de histologia uterina. Endométrio, GP= glândulas profundas (Coloração: hematoxilina e eosina; Barra = 50 µm). Fonte: Arquivo pessoal....	17
<b>Figura 3 -</b>	Útero de cadela; a) Fase inicial de diestro com numerosos ductos glandulares (DG) bem diferenciados e criptas luminais com citoplasma abundante; setas indicam secreções (Coloração: hematoxilina e eosina, 100x); b) Fase final de diestro, com redução de atividade das criptas com citoplasma vacuolizado, as glândulas basais com tamanho reduzido, dilatadas com epitélio achatado (Coloração: hematoxilina e eosina, 100x) e c) Fase final de diestro, endométrio com ductos glandulares dilatados e com epitélio achatado. As células luminais e cristas exibem citoplasma altamente vacuolado (Coloração: hematoxilina e eosina, 400x). Fonte: Golabova <i>et al.</i> (2003).....	18
<b>Figura 4 -</b>	Fotomicrografia de histologia do útero de cadela. Região de miométrio endometrial, M = miométrio (Coloração: hematoxilina e eosina; Barra = 50 µm). Fonte: Arquivo pessoal.....	19
<b>Figura 5 -</b>	Ciclo estral na espécie canina. Fonte: Small Animal Internal Medicine, 4ª edição, 2010.....	21
<b>Figura 6 -</b>	Perfil de expressão do receptor de progesterona no útero de cadelas tratadas para pseudogestação.....	46
<b>Figura 7 -</b>	Perfil de expressão do receptor de estrógeno $\alpha$ no útero de cadelas tratadas para pseudogestação.....	47
<b>Figura 8 -</b>	Perfil de expressão do receptor de andrógeno no útero de cadelas tratadas para pseudogestação.....	48
<b>Figura 9 -</b>	Perfil de expressão do receptor de hormônio tireoidiano $\alpha$ no útero de cadelas tratadas para pseudogestação.....	49
<b>Figura 10 -</b>	Perfil de expressão do receptor de kisspeptina no útero de cadelas tratadas para pseudogestação.....	50
<b>Figura 11 -</b>	Perfil de expressão do receptor de Kiss1R no útero de cadelas tratadas para pseudogestação.....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Lista de anticorpos utilizados na imunohistoquímica.....	45
<b>Tabela 2</b>	– Pontuação proporcional de imunomarcção pela imunohistoquímica...	45
<b>Tabela 3</b>	– Concentrações séricas de PRL em cadelas com pseudociese nos tempos 0h e 120h após a administração de cloridrato de piridoxina (50mg de B6/kg/dia) ou cabergolina (5µg de cabergolina /kg/dia).....	45
<b>Tabela 4</b>	– Dados histomorfométricos do útero de cadelas pseudogestante e tratadas (médias ± EP; CV).....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AR	Receptor de andrógeno
CL	Corpo Lúteo
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
DAB	Diaminobenzina
EG	Epitélio Glandular
EL	Epitélio Luminal
ER $\alpha$	Receptor de estrógeno alfa
FSH	Hormônio folículo-estimulante
HE	Hematoxilina-eosina
LH	Hormônio luteinizante
$\mu$ g	Microgramas
mL	Microlitro
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
Kiss1	Gene codificante de Kisspeptina
Kiss1R	Gene codificante do receptor de Kisspeptina
Kp	Kisspeptina
PR	Receptor de progesterona
PRL	Prolactina
TR $\alpha$	Receptor de hormônio tireoidiano alfa
TRH	Hormônio hipotamâmico liberador de tireotropina
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
°C	Graus Celsius
>	“Maior que”
<	“Menor que”

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>4.1</b>	<b>Histologia uterina.....</b>	<b>16</b>
<b>4.2</b>	<b>Ciclo estral das cadelas.....</b>	<b>19</b>
<b>4.3</b>	<b>Pseudogestação.....</b>	<b>22</b>
<b>4.4</b>	<b>Mediadores hormonais.....</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO I.....</b>	<b>31</b>
<b>5.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2</b>	<b>Material e métodos.....</b>	<b>36</b>
<b>5.3</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>38</b>
<b>5.4</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>40</b>
<b>5.5</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil é crescente o número de cães nas residências, favorecendo uma maior busca por serviços veterinários nas mais diversas especialidades, entre elas a área clínica, cirúrgica e reprodutiva; além disso, é de grande importância o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva das fêmeas caninas (SANTOS; LEAL, 2017), pois o interesse de vários criadores em reproduzir determinada genética e raças específicas é crescente. Além de animais de companhia, os cães também são usados para guarda, assistência rural, assistência a pessoas com deficiência e terapias, geração de renda e pesquisa. Com isso, aumenta a demanda por novos estudos sobre a espécie, principalmente no que diz respeito às doenças e/ou distúrbios relacionados ao sistema genital, comuns nos animais e importantes por causarem infertilidade, aborto, distocias e doença clínica (CARDOSO, 2012).

Uma das síndromes reprodutivas que acometem cadelas adultas não castradas é a pseudociese. Segundo Martins e Lopes (2005) a pseudociese é uma condição apresentada por toda cadela não prenha, com presença de sintomas ou alterações físicas parecidos aos que ocorrem em cadelas gestantes.

A pseudociese, também pode ser conhecida por pseudogestação clínica, pseudoprenhes, falsa gestação, gestação psicológica ou ainda lactação nervosa, sua definição consiste como um distúrbio comumente apresentado por cadelas inteiras não gestantes, seis a quatorze semanas após o estro e, se caracteriza por diversos sinais clínicos e principalmente por simular comportamentos pré, peri e pós-parto (GOBELLO; CONCANNON; VERTENGEN, 2001).

Na espécie canina, a duração da fase lútea é de aproximadamente dois meses, período em que há altas concentrações de progesterona circulante. Por volta da última semana do diestro, há um declínio nas concentrações séricas de progesterona, acompanhado por um aumento nas concentrações de estrógeno e prolactina, alterações semelhantes às observadas em animais no final da gestação. É importante ressaltar que a prolactina age preparando as glândulas mamárias para a lactação e desencadeando o comportamento materno (APPARÍCIO; VICENTE, 2015).

Uma outra particularidade da fisiologia reprodutiva das fêmeas caninas relacionada ao suporte luteotrófico é que, durante a segunda metade da fase lútea, a prolactina (PRL) e o hormônio luteinizante (LH) são considerados como fatores luteotróficos, embora a regressão lútea/luteólise ocorra simultaneamente com concentrações elevadas desses hormônios (RIBEIRO, 2018).

Dessa forma, a pseudociese pode se desenvolver: a) após o término de um tratamento com progestágenos; b) durante um tratamento com progestágenos ou antiprogestágenos; c) após um tratamento com prostaglandina; d) três a quatro dias após a realização de uma ovariectomia durante o diestro. Todas essas situações se caracterizam por exposição à progesterona e subsequente queda desse hormônio (MARTINS; LOPES, 2005).

Os agonistas seletivos (cabergolina) e não-seletivos (bromocriptina) de dopamina e antagonistas serotoninérgicos (metergolina) são os mais utilizados para o tratamento da pseudociese (ROOT *et al.*, 2018). Contudo, Silva *et al.* (2021) descreveram um tratamento alternativo, seguro e eficiente para a redução das concentrações séricas de prolactina, remissão do desenvolvimento mamário e interrupção da lactação em cadelas pseudogestantes com cloridrato de piridoxina (vitamina B6) na dose de 50mg/kg durante 20 dias de tratamento.

Os efeitos dessa substância no útero de cadelas tratadas ainda não foram investigados e são desconhecidos. Por isso, objetiva-se avaliar o efeito da vitamina B6 na expressão de mediadores hormonais uterinos de forma a explicar o mecanismo de ação deste fármaco no útero de cadelas pseudogestantes.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Avaliar se o tratamento com cloridrato de piridoxina altera os mediadores hormonais em cadelas pseudogestantes tratadas, de forma a explicar os mecanismos de ação dessa substância no útero.

### **3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a imunomarcção uterina dos receptores de progesterona, estrógeno, andrógeno, hormônio tireoidiano e do sistema kisspeptina/Kiss1R em cadelas com pseudociese e tratadas com cloridrato de piridoxina e cabergolina.

- Avaliar dados morfométricos do útero nas regiões de epitélio luminal , estroma, diâmetro das glândulas, endométrio e miométrio.



## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Histologia uterina

O sistema genital feminino é formado pelos ovários, tubas uterinas, útero (cornos e corpo), cérvix, vagina e vestíbulo. O útero é um órgão tubular responsável pelo desenvolvimento embrionário e gestação, possuindo três camadas distintas: endométrio, miométrio e perimétrio (APPARÍCIO; VICENTE, 2015). Durante o ciclo estral, o útero sofre alterações morfológicas sob a influência dos hormônios ovarianos (CHATDARONG; KUNKITTI; SRISUWATANASAGUL; 2008).

O endométrio é constituído por uma mucosa revestida por epitélio cúbico simples em fêmeas nulíparas e por epitélio prismático simples (Figura 1) nas multíparas (MONTEIRO *et al.*, 2009). Nas cadelas, o endométrio superficial é formado por tecido conjuntivo contendo glândulas tubulares simples revestidas por epitélio cúbico ou cilíndrico simples, que nas regiões mais profundas (endométrio basal) podem se ramificar (PRIEDKALNS, 1982). A região superior das glândulas, situadas na zona funcional superficial do endométrio, abrange os ductos glandulares, e as partes basais, localizadas na zona basal do endométrio, refere-se as glândulas basais (VERMEIRSCH *et al.*, 1999). A ação endócrina proveniente dos ovários estimula o endométrio, causando alterações estruturais e funcionais, principalmente pela ação de hormônios esteroidais como estrógeno e progesterona. Sob o efeito estrogênico, ocorre proliferação de glândulas endometriais, maior vascularização, maior fluxo sanguíneo e maior atividade metabólica. A progesterona estimula a proliferação e aumento da atividade secretória das glândulas endometriais, fechamento da cérvix e inibição da contratilidade miometrial (VERMEIRSCH *et al.*, 1999; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Na região endometrial são secretadas substâncias como muco, lipídios, glicogênio e proteínas, oriundos dos epitélios de revestimento e glandular. As glândulas se estendem para a submucosa onde são envolvidas por tecido conectivo frouxo hiperplásico (Figura 2). Também estão presentes grande quantidade de células de defesa, as mononucleares e polimorfonucleares (BANKS, 1992).

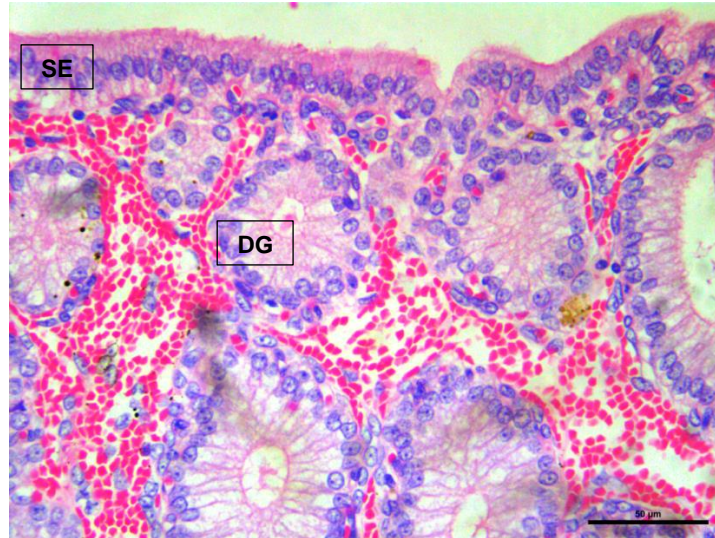


Figura 1 - Fotomicrografia de histologia uterina. Endométrio, SE= superfície epitelial; DG= ducto glandular. (Coloração: hematoxilina e eosina; Barra = 50  $\mu$ m). Fonte: Arquivo pessoal.

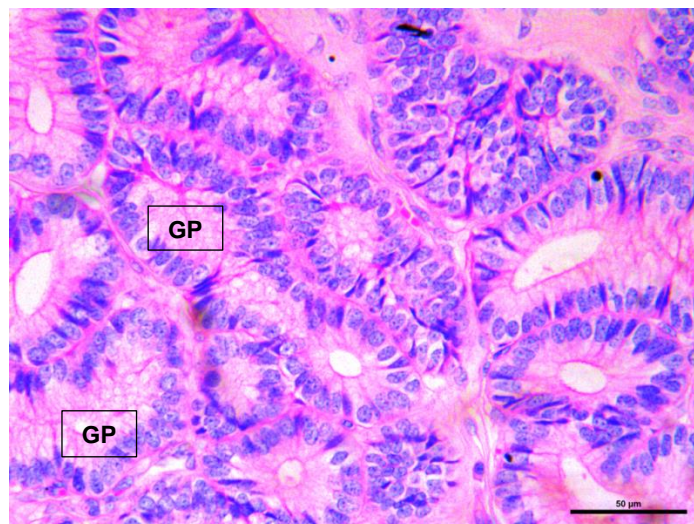


Figura 2 - Fotomicrografia de histologia uterina. Endométrio, GP= glândulas profundas. (Coloração: hematoxilina e eosina; Barra = 50  $\mu$ m). Fonte: Arquivo pessoal.

Um estudo investigando alterações morfológicas no epitélio endometrial de cadelas (Figura 3) concluiu que no diestro, em estágios iniciais e intermediários, devido às altas concentrações de progesterona, ocorre a formação de criptas por protrusões no lúmen uterino que são revestidas por epitélio colunar simples (GALABOVA *et al.*, 2003). O útero das cadelas é desprovido de glândulas endometriais ao nascimento, seu desenvolvimento ocorre no período pós-natal até os seis meses de vida. A presença de glândulas endometriais no útero canino é observada inicialmente por volta de 15 dias de vida e 60 dias depois do nascimento já apresenta conformação de um animal adulto (RAMOS *et al.*, 2015).

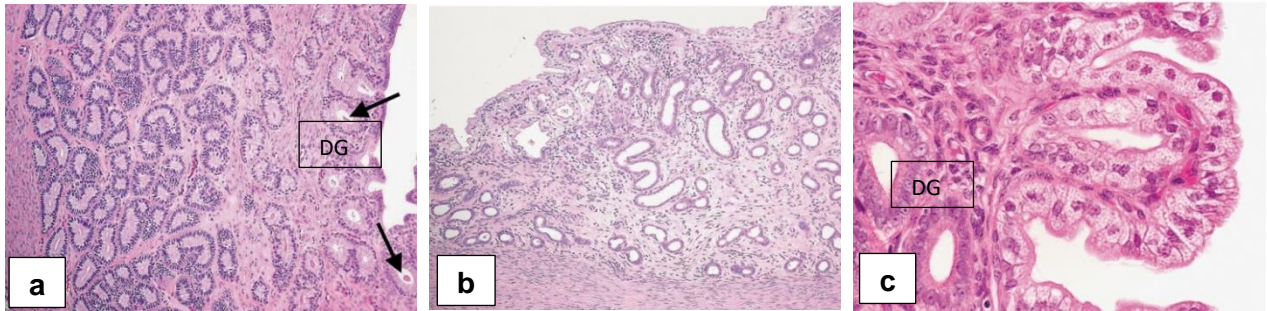


Figura 3 - Útero de cadela; a) Fase inicial de diestro com numerosos ductos glandulares (DG) bem diferenciados e criptas luminais com citoplasma abundante; setas indicam secreções (Coloração: hematoxilina e eosina, 100x); b) Fase final de diestro, com redução de atividade das criptas com citoplasma vacuolizado, as glândulas basais com tamanho reduzido, dilatadas com epitélio achatado (Coloração: hematoxilina e eosina, 100x) e c) Fase final de diestro, endométrio com ductos glandulares dilatados e com epitélio achatado. As células luminais e cristas exibem citoplasma altamente vacuolado (Coloração: hematoxilina e eosina, 400x). Fonte: Golabova *et al.* (2003).

As glândulas endometriais estão presentes no útero de todos os mamíferos e durante sua formação estão envolvidos na diferenciação e desenvolvimento do epitélio glandular, do epitélio luminal e na penetração do estroma uterino e ramificação do epitélio glandular (SPENCER; BAZER, 2004). A importância dessas glândulas acontece pelo fato de que o crescimento e desenvolvimento de um concepto dependem inicialmente do endométrio que primariamente fornece a nutrição pelas secreções produzidas pelas glândulas endometriais (RAMOS *et al.*, 2015).

O miométrio tem a função de contratilidade para auxiliar os espermatozoides e expansão uterina no período gestacional. Possui uma espessa camada de fibras musculares lisas (Figura 4) e divide-se em uma camada circular interna e uma camada longitudinal externa que sofrem hipertrofia e hiperplasia durante a gestação (MARTINS, 2013).

O perimétrio é formado por tecido conectivo frouxo, sendo revestido pelo mesotélio peritoneal. Nessa camada também estão presentes células musculares lisas, fibras nervosas além de inúmeros vasos linfáticos e sanguíneos (PRIEDKALNS, 1982).

Segundo Weber (1944), durante a pseudogestação, o endométrio apresenta indícios de involução. As glândulas profundas se prolongam até o miométrio. As células epiteliais das glândulas profundas são colunares na porção superficial e cuboídes na porção basal. Além disso, nessas células há presença de um núcleo central e pouco material granular no citoplasma. O lúmen das glândulas torna-se maior com presença de pequeno material coloidal e fragmentos de células epiteliais e o miométrio apresenta musculatura desenvolvida.

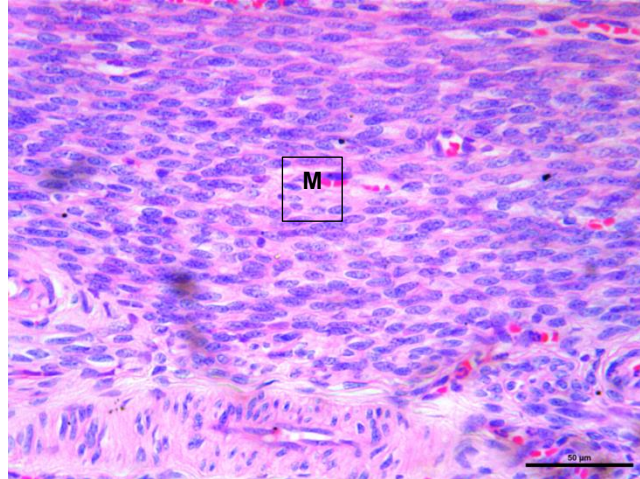


Figura 4 - Fotomicrografia de histologia do útero de cadela. Região de miométrio endometrial, M = miométrio (Coloração: hematoxilina e eosina; Barra = 50  $\mu$ m). Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.2 Ciclo estral das cadelas

A cadela é considerada uma espécie monoéstrica, não sazonal, de ovulação espontânea, seguida de uma fase luteal com duração média em torno de 65 dias quando gestante ou um pouco mais quando não gestante. Posteriormente, ocorre o período de anestro obrigatório. O intervalo interestral pode sofrer variação de 5 a 12 meses, acontecendo comumente entre seis a sete meses (CONCANNON, 2011). O ciclo estral é mediado por mecanismos hormonais e neuroendócrinos, em especial pelos hormônios hipotalâmicos, esteroides de origem ovariana e hipofisária (DIAGONE, 2005). A regulação da secreção de gonadotrofinas durante o ciclo estral exige um balanceamento entre complexas interações hormonais, como por exemplo, modificações nas taxas de síntese, liberação e degradação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O estrogênio estimula o crescimento uterino por mecanismos que envolvem a interação do hormônio com receptores, o aumento dos processos de síntese dentro das células e o estímulo da produção de prostaglandinas pelo útero (HAFEZ; 1995).

De uma forma geral, as cadelas iniciam a puberdade dois a três meses após atingirem o tamanho corporal adulto, ocorrendo geralmente entre seis a 12 meses de idade. As cadelas de raças menores chegam à puberdade mais precocemente que aquelas de raças grandes porque atingem o tamanho adulto mais cedo. O intervalo entre o estro é excepcional por causa de sua duração, com média aproximada de sete meses e meio. O ciclo estral é caracterizado por várias etapas, o proestro, o estro, o diestro e o anestro (Figura 5) (STABENFELDT; EDQVIST, 1996).

O proestro possui duração média de 9 dias, podendo variar entre 3 a 21 dias. Neste período pode ou não ocorrer o aparecimento de uma descarga vaginal hemorrágica, ocasionada pela diapedese eritrocitária por meio do endométrio e rompimento capilar subepitelial (CONCANNON, 2011). Nesta fase, a fêmea apresenta edema e hipertrofia de vulva, a cérvix dilatada, o endométrio espessado, além de ocorrer aumento na atividade glandular e crescimento dos ductos e túbulos da glândula mamária. Nesta fase, a sinalização endócrina mais importante é o aumento constante das concentrações séricas de estradiol (OLIVEIRA; MARQUES JÚNIOR; NEVES, 2003). As concentrações de progesterona aumentam acima de 1 a 3 ng/mL durante o pico pré-ovulatório de LH, depois desse evento continua aumentando, atingindo os valores de 10 a 25 ng/mL por volta do dia 10 do ciclo estral (CONCANNON, 2011).

O estro é caracterizado pela mudança comportamental da cadela, tornando-a mais receptiva ao macho. Este é o período em que as concentrações plasmáticas de estrógeno reduzem e de progesterona aumentam, atingindo concentrações acima de 1 a 3 ng/mL durante o pico pré-ovulatório de LH. A duração dessa fase varia de 5 a 9 dias, com redução do edema vulvar e na secreção vaginal (CONCANNON, 2011). A ovulação ocorre 24 a 48 horas após o pico do hormônio luteinizante (LH). O aumento da concentração da progesterona é responsável pela mudança comportamental da fêmea.

O edema vulvar persiste menos intenso do que no proestro, porém a secreção vaginal sanguinolenta torna-se transparente (CHRISTIANSEN, 1988). Nas cadelas, diferente de outras espécies, os ovócitos são liberados ainda imaturos, sendo necessário de 24 a 48 horas para realizarem a maturação completa. Outra particularidade das cadelas é o processo de luteinização das células foliculares antes da ovulação (CONCANNON, 2011). Depois da ovulação, com a formação do corpo lúteo, a concentração de progesterona eleva-se, atingindo 10 a 20 ng/mL (FELDMAN; NELSON, 2004).

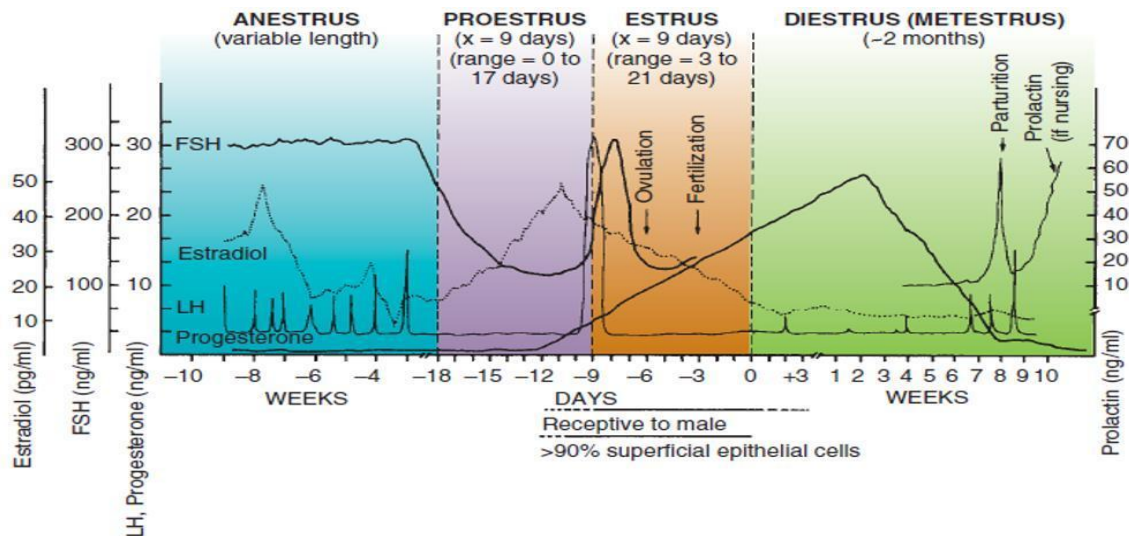


Figura 5 - Ciclo estral na espécie canina. Fonte: Small Animal Internal Medicine, 4ª edição, 2010.

O diestro é fase do ciclo estral sob o domínio da progesterona, que atinge um pico máximo de 15 a 60ng/mL duas a três semanas depois do início desse período, persistindo por uma a duas semanas, sofrendo declínio gradual até 60 dias depois do pico de LH, até atingir valores basais no final desta fase, enquanto os outros hormônios encontram-se essencialmente em concentrações basais (ETTINGER, 1992). A vulva vai apresentando redução do edema local progressivamente até desaparecer, podendo ocorrer limitada de secreção vaginal neste período, principalmente no início do diestro. A cadela apresenta comportamento mais calmo, perde a receptividade e para de atrair o macho (CHRISTIANSEN, 1988).

O tempo de permanência do diestro, baseada na função lútea, é muito similar para cadelas não-gestantes e gestantes. Durante esse período, os níveis de progesterona são semelhantes nas cadelas gestantes, não gestantes e também nas histerectomizadas, evidenciando que nem o útero ou prostaglandinas uterinas seriam responsáveis pela manutenção fisiológica ou regressão do corpo lúteo (CL). Em fêmeas gestantes, a duração da progesterona circulante é por um período de 56 a 68 dias e pode ser de 60 a 100 dias em fêmeas não gestantes (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989). O LH e a prolactina são necessários para a manutenção do CL na maioria das espécies. Na espécie canina, acredita-se que o CL seja hormônio independente durante a primeira metade do diestro e só a partir desse período passa a requerer suporte luteotrófico, principalmente de prolactina (JOHNSTON *et al.*, 2001). O corpo lúteo da cadela gestante e não-gestante é sensível aos efeitos luteolíticos da prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), embora não tanto quanto o observado na maioria das outras espécies (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989). O CL atua como uma glândula endócrina de vida curta. Nas cadelas gestantes, a função do CL declina abruptamente com o

início do parto devido à ação das prostaglandinas (FELDMAN; NELSON, 2004). Entretanto, nas cadelas não-gestantes, essa redução estaria envolvida com a apoptose das células luteínicas (OLIVEIRA; MARQUES JÚNIOR; NEVES, 2003).

Por fim, a última fase do ciclo estral é o anestro. Esse período é caracterizado por uma fase de quiescência e involução uterina, com duração média de 125 dias, podendo variar entre dois a dez meses (CARVALHO; SANTOS; SILVA, 2020). Embora seja considerada uma fase de quiescência reprodutiva, ao final da reparação endometrial, sabe-se que há atividade ovariana (RODRIGUES; RODRIGUES, 2002). Os níveis de estrógeno, progesterona e FSH apresentam valores basais, no início e meio do anestro, ocorrendo aumento do estradiol e FSH no fim dessa fase (OLIVEIRA; MARQUES JÚNIOR; NEVES, 2003).

### **4.3 Pseudogestação**

A pseudogestação é um fenômeno em que a fêmea que não está prenhe exibe comportamento materno tal como adoção de objetos inanimados, aninhamento, desenvolvimento das glândulas mamárias e lactação (APPARÍCIO; VICENTE, 2015). Outros termos também são empregados como pseudogestação clínica, falsa gestação, falsa prenhez, gestação psicológica ou lactação nervosa (GOBELLO; CONCANNON; VERTENGEN, 2001).

O termo pseudogestação foi usado pela primeira vez em 1911 por Ancel e Bouin para descrever uma fase lútea excessivamente longa do ciclo estral observado em coelhas. Esta terminologia justificava-se pela condição em que depois da cópula havia ausência de gestação, porém as alterações ovarianas e uterinas eram semelhantes àquelas observadas durante a gestação (WEBER, 1944).

De acordo com Harvey *et al.* (1997), a condição de pseudogestação em fêmeas caninas foi herdada de seus ancestrais selvagens, como lobos, que viviam em alcateias, cujas fêmeas apresentavam estro juntas, periodicamente. Assim, as fêmeas que não acasalavam e, portanto, não gestavam, passavam por modificações fisiológicas semelhantes àquelas observadas no período pré e pós-parto, o que as permitiam amamentar filhotes de outras fêmeas, representando um mecanismo primitivo útil para manutenção da espécie. Essas fêmeas que não se reproduziam e nem acasalavam eram consideradas submissas às fêmeas alfa, que não permitiam que as primeiras acasalassem. Dessa forma, a pseudogestação seria uma adaptação evolutiva para ajudar animais na perpetuação de suas linhagens genéticas independente de terem sido acasaladas ou não.

Os fatores predisponentes para o desenvolvimento da pseudogestação foi proposta inicialmente pela endocrinologia da fase lútea onde o distúrbio ocorre. A progesterona causa desenvolvimento das glândulas mamária e ganho de peso, semelhante ao estado de prenhez. A queda nas concentrações de progesterona no final do diestro causa um aumento abrupto na secreção de prolactina, hormônio responsável pela lactação e mudanças de comportamento durante a falsa gestação (MARTINS; LOPES, 2005). Como a cadela apresenta ovulação espontânea e sempre entra em uma longa fase luteal, a pseudogestação é um fenômeno comum de ocorrer (NELSON; COUTO, 2010).

A pseudogestação é uma condição patológica frequente que envolve uma série de sinais físicos e comportamentais. Os principais sinais clínicos observados são o aumento das glândulas e secreção mamárias, lactação, ganho de peso ou emagrecimento, dermatite mamária e contrações abdominais. As manifestações comportamentais incluem aninhamento, adoção de objetos, comportamento materno, busca de atenção. Alguns animais também apresentam agitação, irritabilidade, aumento abdominal, anorexia e vômito (GOBELLO; CONCANNON; VERTENGEN, 2001; NELSON; COUTO, 2010; APPARÍCIO; VICENTE, 2015).

O diagnóstico é baseado no histórico e nos achados físicos em uma cadela não prenhe. Antes da realização de um tratamento, é de grande importância uma avaliação por meio de diagnóstico por imagem, para descartar a possibilidade de uma gestação, uma vez que todos os tratamentos para a pseudogestação resultam em danos para a mesma (NELSON; COUTO, 2010).

Por apresentar uma condição autolimitante em cadelas, os casos mais brandos geralmente não requer tratamento farmacológico, uma vez que os sinais clínicos geralmente se resolvem depois de duas ou três semanas. Como tratamento dos casos com sinais clínicos leves pode ser utilizado o colar elizabetano para evitar a lambedura das mamas, restrição hídrica por 5 a 7 noites e restrição alimentar por 24 horas, voltando às quantidades habituais, essas estratégias favorecem na redução da lactação (MIALOT; BEGON; GUERIN, 1984; APPARÍCIO; VICENTE, 2015 ).

Quando há exacerbação dos sinais clínicos, o tratamento farmacológico pode ser realizado com drogas que inibem a liberação de prolactina, tais como agonistas dopaminérgicos e antagonistas serotoninérgicos, que são eficazes para melhorar o comportamento e os sinais físicos da falsa prenhez em cadelas (GOBELLO; CONCANNON; VERTENGEN, 2001).



A cabergolina é o agonista dopaminérgico mais utilizado para inibir a secreção de prolactina em cadelas, pois possui ação direta sobre os receptores D2-dopaminérgicos das células lactotróficas da adenohipófise (JANSSENS, 1986). Apresenta baixa afinidade para os receptores dopaminérgicos do tipo D1; serotoninérgicos dos tipos 5-HT1 e 5-HT2 e adrenérgicos do tipo 1. Além disso, possui poucos efeitos em outras regiões do sistema nervoso central (GOODMAN, 1996).

Em um estudo utilizando cadelas Beagle avaliando os efeitos inibidores da secreção de prolactina durante o diestro, foi utilizada a dose de 5 µg/kg por via subcutânea. A concentração média de prolactina e progesterona no plasma foram drasticamente suprimidas por 4 a 5 dias após a administração da droga, demonstrando ser uma substância altamente potente e de longa ação (ONCLIN; VERSTEGEN, 1997), no entanto, esta droga apresenta como efeito colateral, quadros de vômitos e em casos mais raros, aumento da agressividade (NELSON; COUTO, 2010). Outro estudo utilizando cadelas em diestro observou que este fármaco não afeta a secreção de LH (VERSTEGEN *et al.*, 1994).

A metergolina é primariamente um antagonista de receptores de serotonina, que possui indiretamente uma ação dopaminérgica. Apresenta a característica indesejável de atravessar a barreira hematoencefálica, no entanto, devido a seu fraco efeito antiprolactínico e sua meia-vida curta, não apresenta efeitos colaterais graves (KUSUMA; TAINURIER, 1993). A dose sugerida é de 0,1mg/kg duas vezes ao dia por via oral durante oito dias. Não causa vômito, no entanto, as cadelas podem apresentar hiperexcitabilidade e agressividade (HAMON *et al.*, 1981). Okkens *et al.* (1997) avaliaram o efeito da metergolina sobre a concentração de prolactina em cadelas pseudogestantes e concluíram que a metergolina promove uma grande redução sobre as concentrações plasmáticas de prolactina em cadelas pseudogestantes, além de reduzir os sinais clínicos.

Os tratamentos baseados no uso de estrógenos, progestinas, como o acetato de medroxiprogesterona e andrógenos também suprimem a secreção de prolactina e podem diminuir as manifestações clínicas da pseudogestação, no entanto, não apresentam benefícios que justifiquem seu uso e devem ser evitados devido aos efeitos colaterais que apresentam (GOBELLO; CONCANNON; VERTENGEN, 2001; MARTINS; LOPES, 2005).

O cloridrato de piridoxina (vitamina B6) descoberto recentemente como uma alternativa viável e segura para o tratamento de cadelas com pseudogestação, promove redução da hiperprolactinemia em um período de até sete dias, sem causar nenhum efeito colateral ou alteração da fertilidade (SILVA *et al.*, 2021). Segundo Delitala *et al.* (1976) seu

mecanismo de ação acontece devido ao seu efeito dopaminérgico a nível de sistema nervoso central, sobre o hipotálamo, inibindo a síntese e/ou secreção de prolactina.

A ovariosalpingohisterectomia deve ser evitada durante a fase média a tardia do diestro porque a pseudogestação pode ocorrer como resultado da remoção da fonte ovariana de progesterona, especialmente em cadelas com histórico prévia do distúrbio. Dessa forma, também não é recomendada a cirurgia durante o episódio de pseudogestação (HARVEY *et al.*, 1997).

Em casos de persistência dos sinais clínicos por mais de duas ou três semanas, mesmo após a realização de terapia medicamentosa, deve-se realizar uma investigação para hipotireoidismo. O hipotireoidismo primário está associado ao aumento do hormônio hipotalâmico liberador de tireotropina (TRH), que pode estimular a liberação de prolactina. Eventualmente pode ocorrer em cadelas com hipotireoidismo um aumento na secreção de prolactina, em resposta ao aumento de TRH, que pode resultar em uma produção excessiva de leite caso ocorra a pseudogestação (NELSON; COUTO, 2010).

Vale ressaltar que as cadelas que apresentam o desenvolvimento dessa síndrome não possuem alteração nas taxas de fertilidade ou ocorrência de doenças reprodutivas (GOBELLO; CONCANNON; VERTENGEN, 2001).

#### **4.4 Mediadores hormonais**

Os efeitos causados por fármacos ou medicamentos são provenientes de sua interação com componentes macromoleculares das células, como receptores, enzimas, proteínas transportadoras e canais iônicos. Os hormônios exercem seus efeitos biológicos por sua ligação a receptores hormonais específicos nas células-alvo e o tipo de receptor é determinado, em grande parte, pela estrutura química do hormônio (proteico, aminas e esteroides). Com base em sua localização celular, os receptores hormonais são classificados em receptores de membrana celular ou receptores intracelulares (ARANDA; PASCUAL, 2001).

Os receptores hormonais são proteínas que contem sítios específicos de ligação. Essas ligações modificam a conformação do receptor, iniciando a síntese de RNA mensageiro específico, que é translocado ao citoplasma, onde há síntese de uma proteína específica, a qual promove uma resposta celular (GONÇALVES *et al.*, 2007). As funções hormonais são mediadas por estes receptores e ligantes em tecidos específicos. Estes receptores são proteínas solúveis que se ligam ao DNA para regular a transcrição de genes específicos. São membros

de uma grande família de fatores de transcrição que podem ser regulados por fosforilação e/ou associação com outras proteínas celulares (MONTEZANO; TORRES, 2005). Os receptores nucleares constituem uma superfamília de fatores de transcrição regulados pela interação com hormônios. Esta superfamília inclui, por exemplo, os receptores de progesterona, estrogênio, andrógeno, hormônio tireoidiano, glicocorticoide e mineralocorticoide (NASCIMENTO, 2009).

O estrogênio induz a proliferação das glândulas endometriais e a progesterona induz a ramificação, sendo também responsável pelo início da secreção glandular para o lúmen uterino (DE COCK *et al.*, 1997). Segundo Bole-Feysot *et al.* (1998), e Grosdemoug *et al.* (2003), em estudos com macacos, a prolactina influencia a secreção de progesterona e seus receptores no epitélio uterino, promovendo um ambiente favorável para a implantação.

Vermeirsch *et al.* (1999) relataram uma correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de progesterona e a expressão de receptores de estrogênio em cornos uterinos de cadelas. Foi observada nos cornos uterinos que no período de proestro havia maior expressão de receptores de estrogênio, ocorrendo redução no período de estro e no início do diestro a expressão ainda é mais fraca. Além disso, houve maior oscilação de imunomarcagem de receptores de estrogênio nas células do estroma endometrial do que nas células epiteliais no útero.

Haralabos *et al.* (2004) observaram que cadelas em diestro fisiológico apresentaram concentrações significativamente maiores de receptores de progesterona uterino comparado com cadelas que apresentaram piometra. As concentrações de progesterona na corrente sanguínea são crescentes durante o estro até as primeiras semanas do diestro, atingindo um limite nas suas concentrações e retornando de forma gradual para valores basais depois dessa fase do ciclo estral (OLIVEIRA; MARQUES JÚNIOR; NEVES, 2003). O útero responde ao aumento da concentração de progesterona mantendo a estrutura glandular e vascularização uterina adequada tanto em cadelas gestantes ou não gestantes, na fase de diestro (OLIVEIRA; MARQUES JÚNIOR; NEVES, 2003). Foi possível verificar no endométrio de cadelas ao longo do ciclo estral pela imunohistoquímica, grande quantidade de receptores de progesterona durante o proestro, redução na fase de estro, com aumento na expressão na fase final de diestro (VERMEIRSCH *et al.*, 2000). Durante o diestro, as células uterinas expressaram forte imunomarcagem para receptores de progesterona e moderada imunomarcagem para receptores de estrogênio (MARINKOVIĆ *et al.*, 2018). Além disso, Silva e Meira (2014) relataram que a expressão proteica dos receptores de progesterona e estrogênio é diferente dentro dos tecidos que compõe o útero (endométrio e miométrio).

A presença de andrógenos endógenos em concentrações fisiológicas é essencial para o correto desenvolvimento e função do sistema genital, tanto masculino quanto feminino. Os andrógenos exercem suas funções ligando-se ao receptor de andrógeno, um membro da superfamília de receptores nucleares (KUIPER *et al.*, 1989). Muitas pesquisas têm demonstrado a importância de andrógenos circulantes como reguladores fisiológicos da reprodução da fêmea e já foram identificadas alterações reprodutivas como, por exemplo, falha ovariana prematura em fêmeas que apresentaram redução de receptores de andrógeno (SHIINA *et al.*, 2006).

Nas mulheres, a produção de andrógenos circulantes é em grande parte proveniente dos ovários e das glândulas suprarrenais, assim como da transformação em tecidos periféricos. A expressão dos receptores de andrógenos pode ser observada no endométrio, das células do estroma endometrial. Em tecidos alvo de andrógeno, os precursores circulantes são ativados para mediar os efeitos locais, além disso, pesquisas recentes relatam que há diferença entre as concentrações de esteroides detectadas no tecido endometrial daquelas encontradas na circulação periférica (GIBSON; SIMITSIDELLIS; SAUNDERS, 2016).

Existem relatos sobre a detecção de receptores de andrógeno em diversos tecidos femininos, incluindo ovários, tecido adiposo, pele, cérebro, músculos e útero (KIMURA *et al.*, 1993). No endométrio de mulheres, a expressão de receptores de andrógeno é encontrada principalmente em fibroblastos estromais das camadas basal e funcional durante a fase proliferativa ou estrogênica, ocorrendo redução expressiva durante a fase secretora ou progesterônica do ciclo menstrual (MERTENS *et al.*, 2001). Apesar da baixa expressão de receptores de andrógeno nas células epiteliais do endométrio durante a fase secretora, foi observado que em mulheres fazendo uso de anti-progestógeno mifepristona, o endométrio mostrou uma expressão elevada de receptores de andrógeno em células epiteliais e estromais (NARVEKAR *et al.*, 2004).

Pesquisas imunohistoquímicas indicam que o receptor de andrógeno é encontrado em células estromais e em células endoteliais que revestem as artérias endometriais na decídua do primeiro trimestre da gestação em mulheres (CRITCHLEY; SAUNDERS, 2009). Esses resultados demonstram que o endométrio possui uma capacidade de funcionar como um órgão alvo de andrógeno. Além de atuarem como tecido alvo, novos estudos indicam um papel para a síntese local de andrógenos e sinalização via mecanismos intrácrinos dentro do endométrio (GIBSON; SIMITSIDELLIS; SAUNDERS, 2016).

Foi descrito por Slayden *et al.* (2001) que macacos tratados com associação de estrógeno e progesterona reduziram a expressão de receptores de andrógeno. O feto e placenta

tornam-se uma fonte adicional de produção de andrógenos, durante a gestação (MAKIEVA; SAUNDERS; NORMAN, 2014). Na estrutura ovariana, os andrógenos são produzidos pelas células do corpo lúteo (SANDERS; STOUFFER; BRANNIAN; 1996). Acredita-se que os andrógenos são eficientes para as contrações miométriais (MAKIEVA; SAUNDERS; NORMAN, 2014). Em cadelas foi investigada a expressão do receptor de andrógeno no sistema genital ao longo do ciclo estral, sendo identificada coloração nuclear marrom, indicando presença deste receptor em todas as regiões endometriais, células do epitélio superficial, ductos glandulares, glândulas basais, estroma e no miométrio. Além disso, a coloração nuclear foi observada em células epiteliais na fase de proestro até o início do metestro, quando as células produziam secreções e nas células do estroma durante a gestação, indicando que os andrógenos possuem influência durante a decidualização. Já no período de gestação e no período pós-parto, a coloração nuclear do receptor foi pouco perceptível. Ao longo do ciclo estral, foi identificado que as células estromais do endométrio apresentaram imunomarcção mais intensa dos receptores de andrógeno do que as células epiteliais, sugerindo que essas células modulem alguns efeitos dos hormônios esteroides nas células epiteliais do trato genital das cadelas (VERMEIRSCH *et al.*, 2002).

Em humanos, o endométrio tem demonstrado ser um produtor extratireoidiano de hormônio como, Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4) (DETTI *et al.*, 2013). Alterações nas concentrações de T3 e T4 afetam a morfofisiologia uterina por ativar de forma inadequada seus receptores ao longo do ciclo estral e, também influencia as concentrações plasmáticas de esteroides sexuais, afetando a ação trófica desses hormônios no sistema genital (GRATTAN *et al.*, 2015)

O papel dos receptores de hormônio tireoidiano alfa não está elucidado, no entanto acredita-se que essa isoforma seja mais abundante na fase secretora do ciclo menstrual da mulher (AGHAJANOVA *et al.*, 2011). Um estudo com coelhos demonstrou a presença de receptores de hormônio tireoidiano alfa no útero, nas regiões de endométrio e miométrio no período de gestação (RODRÍGUEZ-CASTELÁN *et al.*, 2017). Além disso, o receptor de hormônio tireoidiano já foi descrito no miométrio e endométrio de macacos (HULCHIY *et al.*, 2012). Em outro estudo com coelhos, foi observado que fêmeas com hipotireoidismo apresentaram alta expressão de receptores de hormônio tireoidiano alfa no útero (RODRÍGUEZ-CASTELÁN *et al.*, 2019). É sabido que a dopamina e o hormônio liberador de tireotropina (TRH) são importantes na homeostase da prolactina (KOLSTER *et al.*, 2010).

A kisspeptina, um polipeptídeo de 145 aminoácidos, é clivada por enzimas proteolíticas e transformadas em peptídeos mais curtos com 54 aminoácidos (KP - 54;

metastina), 14 aminoácidos (KP - 14), 13 aminoácidos (KP - 13) ou 10 aminoácidos (KP - 10) (SCHÄFER-SOM *et al.*, 2016.) Sua atuação é fundamental no sistema reprodutor, sendo considerada um hormônio chave na reprodução e sua expressão pode ser encontrada em diversos tecidos (KOTANI *et al.*, 2001). Foi demonstrado que a kisspeptina e o receptor da kisspeptina são expressos no ovário e no útero, indicando uma ação periférica local adicional na reprodução ao nível extra-hipotalâmico (TANYAPANYACHON *et al.*, 2018).

Em humanos, a expressão da kisspeptina e seu receptor (Kiss1/Kiss1R) está localizada principalmente em células epiteliais e estromais do útero, mas não do miométrio (CEJUDO *et al.*, 2012). Em cadelas foi demonstrada expressão de Kiss/Kiss1R em células ovarianas (CIELESH *et al.*, 2017) e no útero foi observada expressão nos períodos de pré e pós-implantação (SCHÄFER-SOMI *et al.*, 2016). Em felinos, foi observado maior expressão de kisspeptina no útero em diestro enquanto Kiss1R apresentou maior expressão durante o período de proestro/estro (SANTOS *et al.*, 2012).

Além de seu papel essencial na secreção de LH, a kisspeptina também está envolvida no controle da secreção de prolactina (AQUINO *et al.*, 2019). A kisspeptina aumenta a secreção de prolactina através da inibição de neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares, no entanto essa ação exige concentrações elevadas de estradiol (RIBEIRO *et al.*, 2015). Em um estudo utilizando células luteais de ratos, foi observado que a kisspeptina promove a secreção de progesterona pelas células luteais por meio do aumento de enzimas esteroidogênicas (PENG *et al.*, 2013).

Alguns autores sugerem que a kisspeptina tem um papel importante na secreção de progesterona (GAYTÁN *et al.*, 2009). Acredita-se que a kisspeptina produzida possa atuar nas células da granulosa agindo para síntese e secreção de progesterona também em caninos (CIELESH *et al.*, 2017).

Estudos indicam que neurônios kisspeptinérgicos participem do controle da secreção de prolactina, pois durante a lactação há uma redução da expressão de Kiss1, período de maior secreção de prolactina (YAMADA *et al.*, 2007). A expressão da kisspeptina e do seu receptor nos ovários e útero em diferentes estágios ovarianos indicam possíveis ações locais na função oocitária, esteroidogênese, remodelação ovariana dentro do ovário e adenogênese dentro do útero (TANYAPANYACHON *et al.*, 2018).

A expressão de Kiss1R é modulada pela atuação do estrógeno, devido sua ação direta sobre os neurônios dopaminérgicos. Foi observado que a kisspeptina estimula a secreção de prolactina, mediante suplementação estrogênica (SZAWKA *et al.*, 2010). Foi observado no útero de cadelas não gestantes, após ovulação, alta expressão de kisspeptina enquanto que no

útero de cadelas gestante alta expressão de Kiss1R ( SCHÄFER-SOM *et al.*, 2016). Dessa forma, sugere-se que o sistema Kiss1/Kiss1R exerce um papel importante no processo de decidualização (ZHANG *et al.*, 2014).

Até o presente momento não foram relatados estudos sobre a expressão de mediadores hormonais sexuais e do sistema Kiss/Kiss1R no útero de cadelas pseudogestantes e tratadas, por isso, acreditamos que os achados deste estudo podem contribuir para elucidar o efeito da vitamina B6 no útero, modulando localmente a ação de hormônios sexuais, hormônio tireoidiano, Kisspeptina e seu receptor, gerando importante contribuição para área de endocrinologia da reprodução de cães.

## 5 ARTIGO CIENTÍFICO I

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES PARA HORMÔNIOS SEXUAIS,  
TIREOIDIANO E DO SISTEMA KISSPEPTINA/KISS1R NO ÚTERO DE  
CADELAS PSEUDOGESTANTES TRATADAS COM CLORIDRATO DE  
PIRIDOXINA E CABERGOLINA**



1 **Expressão de receptores para hormônios sexuais, tireoidiano e do sistema**  
2 **kisspeptina/kiss1r no útero de cadelas pseudogestantes tratadas com cloridrato de**  
3 **piridoxina e cabergolina**

4

5 Larissa Rodrigues Santana<sup>1\*</sup>, Raquel Vieira Niella<sup>1</sup>, Luciano Cardoso Santos<sup>2</sup>, William  
6 Morais Machado<sup>1</sup>, Juneo Freitas Silva<sup>2</sup>, Paola Pereira das Neves Snoeck<sup>1</sup>.

7

8 Hospital Veterinário, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade  
9 Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Ilhéus, Brasil.

10 Centro de Microscopia Eletrônica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade  
11 Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Ilhéus, Brasil.

12

13 Conflito de interesse

14 Os autores declaram que não existe nenhum conflito de interesse.

15

16 \*Autor correspondente. Endereço atual: Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus,  
17 Bahia, Brasil. Telefone: +5571991136860. Orcid.org/0000-0001-9176-6324  
18 Email:lrsantana@uesc.br

19

20 **Destaque**

21 - Este é o primeiro relato demonstrando a expressão de PR, ER $\alpha$ , AR, TR $\alpha$  e sistema  
22 Kiss/Kiss1R no útero de cadelas pseudogestante tratadas com vitamina B6 e cabergolina por  
23 imunohistoquímica.

24 - A imunomarcção de AR em ducto glandular é significativamente maior em cadelas tratadas  
25 com Vitamina B6 do que com cabergolina.

26 - O TR $\alpha$  é expresso em diferentes regiões uterinas na cadela pseudogestante com redução  
27 significativa na superfície epitelial nas cadelas tratadas com vitamina B6.

28 - A cabergolina reduz a expressão de Kisspeptina na superfície epitelial.

29

30

31

## 32 RESUMO

33 O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do cloridrato de piridoxina na histomorfometria e  
34 imunomarcção uterina dos receptores para progesterona (PR), estrógeno (ER $\alpha$ ), andrógeno  
35 (AR) e hormônio tireoidiano (TR $\alpha$ ) como também a kisspeptina e Kiss1R em cadelas tratadas  
36 para pseudogestação. Para o estudo foram utilizados fragmentos uterinos de 18 cadelas  
37 divididos em três grupos: 1) controle pseudogestante (n=6); 2) tratado com cloridrato de  
38 piridoxina (50 mg/kg/dia; n=6); e 3) tratado com cabergolina (5 $\mu$ g/kg/dia; n=6). A prolactina  
39 sérica foi dosada no primeiro e quinto dia de tratamento para controle da hiperprolactinemia.  
40 As cadelas com pseudogestação foram tratadas por 20 dias, submetidas a cirurgia de ovário-  
41 salpingo-histerectomia e os fragmentos uterinos foram fixados em formaldeído a 10% por 24  
42 horas e depois processados pela técnica de inclusão em parafina. Avaliou-se a imunomarcção  
43 no epitélio luminal uterino, ductos glandulares, glândulas profundas, estroma e miométrio. Foi  
44 observado redução nas concentrações séricas de prolactina de cadelas com pseudogestação  
45 tratadas com cloridrato de piridoxina e cabergolina, apresentando semelhante eficácia (P >  
46 0,05) e diferindo (P < 0,05) do grupo pseudogestante. O útero de cadelas pseudogestante e  
47 tratadas apresentou forte imunomarcção de PR (P > 0,05). Em contraste, os receptores ER $\alpha$   
48 E Kiss1R apresentaram imunomarcção fraca a nula em todas as regiões uterinas, mas não  
49 houve diferença entre os grupos estudados (P > 0,05). No útero de cadelas tratadas com  
50 piridoxina houve aumento de imunomarcção de AR nos ductos glandulares (P < 0,05).  
51 Houve redução significativa da imunomarcção de TR $\alpha$  na superfície epitelial do útero em  
52 cadelas tratadas com piridoxina comparada a cabergolina, sendo a imunomarcção de TR $\alpha$   
53 proporcionalmente mais elevada no grupo controle do que no tratado (P < 0,05). A  
54 imunomarcção de kisspeptina em superfície epitelial uterina foi maior no grupo controle  
55 comparado ao grupo tratado com cabergolina (P < 0,05). A análise histomorfométrica  
56 constituiu de mensurações de altura do epitélio luminal, epitélio glandular, espessura do  
57 miométrio, endométrio e número de glândulas endometriais. As mensurações morfométricas  
58 não apresentaram diferença entre o grupo controle e os tratados (P > 0,05). Concluiu-se que o  
59 cloridrato de piridoxina e cabergolina tiveram efeito local ou modularam a expressão de  
60 receptores de andrógeno e hormônio tireoidiano no útero de cadelas.

61 **Palavras-chaves:** Endométrio; Kisspeptina; Vitamina B6; Progesterona; Pseudociese; *Canis*  
62 *familiaris* .

63

64

65

66

67

68

69

70

71

## 72 5.1 Introdução

73 A pseudogestação é uma síndrome frequentemente observada em cadelas cíclicas. Os  
74 níveis reduzidos de progesterona, associado ao aumento da prolactina são um dos fatores  
75 predisponentes ao desencadeamento desta síndrome (GOBELLO, 2021) no final do diestro.  
76 Rotineiramente, para o tratamento da pseudogestação são utilizados fármacos  
77 antiprolactinêmicos como a cabergolina e bromocriptina. A cabergolina é o medicamento de  
78 eleição por causa de sua maior bioatividade e duração mais longa do que outros agonistas  
79 dopaminérgicos como a bromocriptina (JANSSENS, 1986; OKKENS *et al.*,1997).  
80 Recentemente, o cloridrato de piridoxina (vitamina B6) mostrou-se uma alternativa segura e  
81 eficaz no tratamento desta síndrome, tendo em vista sua atuação na redução dos sinais clínicos  
82 de hiperplasia mamária e secreção láctea (SILVA *et al.*, 2021). Sabe-se que o cloridrato de  
83 piridoxina possui um efeito dopaminérgico no sistema nervoso central, sobre o hipotálamo,  
84 inibindo a síntese e/ou secreção de prolactina (FOUKAS, 1973; HARRIS ; SMITH; ALEX,  
85 1978), no entanto, seu efeito periférico, principalmente no útero ainda não foi relatado, pois  
86 faltam estudos que descrevam o padrão de expressão de receptores hormonais uterino.  
87 Compreender o funcionamento molecular do endométrio das cadelas pode contribuir de forma  
88 preventiva e terapêutica nas patologias relacionadas ao endométrio não gravídico  
89 (JOHNSTON; ROOT-KUSTRITZ; OLSON, 2001).

90 A função endometrial é modulada por esteroides circulantes que se ligam a receptores  
91 ativados por ligantes e iniciam uma cascata de eventos moleculares e celulares  
92 (CRITCHLEY; SAUNDERS, 2009). Os receptores para andrógenos, estrógenos,  
93 progestágenos, glicocorticóides, mineralocorticóides, hormônios da tireoide são essenciais  
94 para muitas funções reprodutivas (NANJAPPA *et al.*, 2017), entre elas mediar os efeitos  
95 biológicos na proliferação, diferenciação e homeostase celular  
96 (BOONYARATANAKORNKIT ; EDWARDS , 2007). De acordo com o modelo clássico de  
97 sinalização dos receptores esteroidais, a ligação pode ocorrer por meio da membrana  
98 plasmática, citoplasma ou no núcleo (LEVIN; HAMMES, 2016). Após a ligação com os  
99 receptores, o complexo ligante-receptor entra nos núcleos para regular a expressão de genes-  
100 alvo e influencia uma variedade de atividades biológicas, por exemplo, a proliferação celular  
101 endometrial (HAMMES; LEVIN, 2007). A resposta funcional do tecido uterino ao impacto da  
102 progesterona é, em parte, determinada pela disponibilidade de seus receptores nos diferentes  
103 tipos de células uterinas (AMSO; CROW; SHAW, 1994).

104 Além dos hormônios esteroidais, outro hormônio muito importante considerado um  
105 regulador-chave na reprodução é a kisspeptina (KOTANI *et al.*, 2001). Sua atuação ocorre via  
106 Kiss1R, após a codificação pelo gene Kiss1, e sua importância acontece devido a participação  
107 dos mecanismos no desenvolvimento da puberdade e manutenção dos processos reprodutivos  
108 (ROSEWEIR; MILLAR, 2009). Além de seu papel essencial na secreção de LH, a kisspeptina  
109 também está envolvida no controle da secreção de prolactina (AQUINO *et al.*, 2019),  
110 hormônio chave na fisiopatologia da pseudogestação. Foi demonstrado que a Kiss1 e seu  
111 receptor são expressos no ovário e no útero, indicando uma ação periférica local adicional na  
112 reprodução ao nível extra-hipotalâmico (TANYAPANYACHON; AMELKINA;  
113 CHATDARONG, 2018). Em cadelas foi demonstrada a expressão de Kiss/Kiss1R em células  
114 ovarianas (CIELESH *et al.*, 2016) e no útero foi observada expressão nos períodos de pré e  
115 pós-implantação (SCHÄFER-SOMI *et al.*, 2016).

116 As alterações nas concentrações de receptores de esteroides podem afetar a  
117 disponibilidade local desses receptores, podendo contribuir com as mudanças na função dos  
118 hormônios esteroides em células-alvo dentro do endométrio, influenciando no  
119 desenvolvimento de distúrbios da função endometrial e subfertilidade (CRITCHLEY;  
120 SAUNDERS, 2009).

121 Assim, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito do tratamento da  
122 pseudogestação com cloridrato de piridoxina e cabergolina na expressão de progesterona,  
123 estrógeno, andrógeno, hormônio tireoidiano, kisspeptina e de receptores para kisspeptina  
124 (Kiss1R) e histomorfometria no útero de cadelas.

125

## 126 5.2 Material e métodos

127 O presente estudo teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)  
128 da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) (Processo nº031/19).

### 129 5.2.1 Seleção dos animais e delineamento experimental

130 Cadelas sem raça definida, entre dois e seis anos de idade, com peso variando entre  
131 5 e 15 kg, apresentando hiperplasia mamária e secreção láctea associada à pseudogestação,  
132 em estágio de diestro confirmado por citologia vaginal foram alocadas nos seguintes grupos  
133 experimentais: 1) Grupo controle (placebo) (n=6); 2) Grupo cloridrato de piridoxina (50  
134 mg/kg/dia de vitamina B6; n=6) e 3) Grupo cabergolina (5µg/kg/dia; n=6). Os fármacos para  
135 tratamento da pseudogestação foram administrados diariamente, por via oral, em forma de  
136 cápsulas manipuladas por 20 dias no período da manhã. As cadelas eram avaliadas  
137 semanalmente quanto à hiperplasia mamária, produção de leite e clinicamente para registro de  
138 possíveis queixas e efeitos colaterais indesejados até o momento da ovário-salpingo-  
139 hysterectomia (OSH). Foram realizadas dosagens de prolactina (PRL) no dia zero, duas horas  
140 antes da administração da primeira dose do fármaco e 120 h após o início do tratamento  
141 para avaliar seu efeito na redução da PRL circulante. Para isso, amostras de sangue (5mL)  
142 foram obtidas por punção venosa jugular em tubos de coleta à vácuo com ativador de coágulo,  
143 centrifugadas a 3000 rpm durante 7 minutos para obtenção de soro, alíquotadas em tubos de  
144 microcentrífuga (500µL) e armazenadas a -20° C até a análise laboratorial. O sistema genital  
145 foi avaliado durante o procedimento de OSH e fragmentos de 2cm<sup>2</sup> de útero foram coletados  
146 do terço médio de ambos os cornos uterinos. Os fragmentos foram fixados em formaldeído  
147 neutro tamponado a 10% por 24 horas e processados pela técnica de inclusão de parafina.

### 148 5.2.2 Imunohistoquímica

149 Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase,  
150 Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em  
151 banho-maria a 98°C por 20 minutos utilizando solução de ácido cítrico, com o pH 6,0. Em  
152 seguida, a solução com as amostras passou por resfriamento em temperatura ambiente por 20  
153 minutos e o processo finalizado com a lavagem das lâminas em tampão PBS com pH 7,2.

154 O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em  
155 álcool metílico (pH 7,2) com incubação de 30 minutos e soro de bloqueio por 30  
156 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente (Ultra vision Block, Lab Vision Corp.<sup>®</sup>,

157 Fremont, CA, USA). Realizou-se a incubação em câmara úmida com o anticorpo primário  
158 durante 18h ou 40h à temperatura de 4°C. Foram utilizados os anticorpos anti-PR (sc - 130071  
159 – Santa Cruz Biotechnology. CA, USA), anti-ER $\alpha$  (6f11 - Thermo Fisher Scientific), anti-AR  
160 (PG-21 EMD Millipore Corp, USA), anti-TR $\alpha$  (434800 - Invitrogen Corporation), anti-Kiss1  
161 (sc - 101246, Santa Cruz Biotechnology. CA, USA) e anti- Kiss1R (HPA 071913, Sigma-  
162 Aldrich, Missouri, USA; Tabela 1).

163 Após o período de incubação em câmara úmida com o anticorpo primário, as amostras  
164 foram incubadas com o anticorpo secundário por um período de 45 minutos. Para a revelação  
165 foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (DAB Substrate system, Lab Vision  
166 Corp., Fremont, CA. USA) e por último, as secções foram contracoradas com hematoxilina de  
167 Harris.

168 Foi realizada uma avaliação qualitativa da expressão imunohistoquímica de PR, ER $\alpha$ ,  
169 AR e TR $\alpha$  no útero e determinada a proporção de imunomarcção em cinco regiões: epitélio  
170 luminal, ductos glandulares, glândulas endometriais profundas, estroma e miométrio. Os  
171 grupos de células reagentes receberam uma pontuação imunohistoquímica que consistiu na  
172 adição de uma pontuação proporcional, representada pela porcentagem de núcleos de células  
173 que apresentaram coloração positiva nos diferentes grupos de células (Tabela 2). Nessas áreas  
174 representativas, pelo menos 200 células foram avaliadas no aumento de 400x por dois  
175 observadores independentes (SCHÄFER-SOMI *et al.*, 2016).

176 A avaliação da kisspeptina e Kiss1R foi quantitativa e a área de imunomarcção foi  
177 determinada por meio do software WCIF ImageJ<sup>®</sup> (Media Cybernetics Manufacturing,  
178 Rockville, MD, USA). Foi utilizado o color deconvolution e thresholding para realizar  
179 análise das imagens. Imagens do útero foram fotografadas em microscópio Leica DM 2500  
180 utilizando a câmara digital Leica DFC 295 (Leica Microsystems, Germany). Os dados foram  
181 arquivados, analisados e expressos como área de imunomarcção em pixels (SILVA *et al.*,  
182 2012).

### 183 5.2.3 Análise Histomorfométrica

184 A análise histomorfométrica de altura do epitélio luminal, as espessuras do endométrio  
185 e miométrio, além do número de glândulas/área foi realizada nos cortes histológicos corados  
186 com hematoxilina e eosina, avaliados em microscópio óptico na objetiva de 10x. As variáveis  
187 foram analisadas em 10 regiões aleatórias em cada segmento de corno uterino e obtida a

188 média por região (GALABOVA *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2009). Depois foi aplicado  
189 um fator de correção dessa média com auxílio de uma escala de lâmina micrométrica. As  
190 imagens foram capturadas em um Microscópio fotônico Leica DM2500 e as mensurações  
191 foram realizadas com a utilização do software Image Pro Plus<sup>®</sup> versão 4.5, sendo os valores  
192 transformados para milímetros com o auxílio de uma escala micrométrica.

#### 193 5.2.4 Análise Estatística

194 Os dados foram apresentados como média  $\pm$  SEM. Os valores médios foram obtidos  
195 para comparação entre dois grupos usando o teste “t de Student” não pareado ou análise de  
196 variância (ANOVA), seguido pelo Student-Teste de Newman-Keuls (SNK) para comparações  
197 múltiplas usando o GraphPad Software Prisma 8.0.2. Todos os dados passaram no teste de  
198 normalidade de Shapiro-Wilk, com  $P > 0,05$ .

199

### 200 5.3 Resultados

201 As concentrações séricas de prolactina (PRL) reduziram com a administração de  
202 cloridrato de piridoxina e cabergolina demonstrando que os dois fármacos foram igualmente  
203 eficientes ( $P > 0,05$ ) no controle da hiperprolactinemia, diferenciando-se ( $P < 0,05$ ) do grupo  
204 controle não tratado, conforme Tabela 3.

205 Foi observado na imunohistoquímica padrão homogêneo para o receptor de  
206 progesterona, com imunomarcção nuclear moderada a forte nas regiões de epitélio luminal,  
207 ductos glandulares e imunomarcção forte a muito forte na região de miométrio. Em relação a  
208 proporção de células marcadas foi observado grande área de coloração em todas as regiões  
209 uterinas e todos os grupos apresentaram pontuações semelhantes ( $P > 0,05$ ; Fig. 1).

210 A imunomarcção de  $E\alpha$  apresentou padrão heterogêneo, com fraca coloração nuclear  
211 em todas as regiões uterinas estudadas. Tanto os grupos tratados quanto o grupo controle  
212 pseudogestante apresentaram padrão semelhante de imunomarcção ( $P > 0,05$ ). Em relação à  
213 proporção de células marcadas, houve pouca área de coloração em todas as regiões uterinas e  
214 todos os grupos apresentaram pontuações semelhantes ( $P > 0,05$ ; Fig. 2).

215 O AR apresentou um padrão heterogêneo, com imunomarcção nuclear fraca a nula  
216 nas regiões de epitélio superficial, ductos glandulares e glândulas profundas para todos os  
217 grupos, enquanto nas regiões de estroma e miométrio a imunomarcção foi fraca a moderada.

218 O grupo tratado com piridoxina apresentou maior proporção de células marcadas na região de  
219 ductos glandulares quando comparado com o grupo tratado com cabergolina ( $P < 0,05$ ). Nas  
220 demais regiões não foram observadas diferença na proporção de células marcadas para todos  
221 os grupos avaliados ( $P > 0,05$ ; Fig. 3).

222 O TR $\alpha$  apresentou um padrão heterogêneo, com imunomarcção nuclear mais fraca na  
223 superfície epitelial, ductos glandulares e glândulas profundas nos grupos tratados, com  
224 imunomarcção mais homogênea entre o grupo pseudogestante e tratado na região de  
225 estroma. Em relação a proporção de células marcadas, houve menor área de  
226 imunomarcção na região de superfície epitelial no grupo tratado com piridoxina em relação  
227 ao grupo tratado com cabergolina ( $P < 0,05$ ). Essa redução foi observada também nas  
228 regiões de ductos glandulares e glândulas profundas quando o grupo tratado com piridoxina  
229 foi comparado como pseudogestante ( $P < 0,05$ ). Na região do miométrio houve maior área de  
230 imunomarcção nas cadelas pseudogestantes quando comparada com o grupo tratado com  
231 cabergolina ( $P < 0,05$ ; Fig. 4).

232 A kisspeptina apresentou imunomarcção citoplasmática moderada a forte nas  
233 diferentes regiões uterinas. Foi observada diferença na expressão de Kiss1 na região de  
234 superfície epitelial entre o grupo tratado com cabergolina e o grupo pseudogestante ( $P < 0,05$ ;  
235 Fig. 5). Na região de glândulas profundas houve forte imunomarcção, no entanto, não houve  
236 diferença entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Apesar de não ser evidenciada diferença estatística,  
237 podemos observar imunomarcção forte no grupo tratado com piridoxina na região de  
238 miométrio. De forma inversa, a expressão de Kiss1R apresentou um padrão homogêneo em  
239 todas as regiões do útero estudadas, com imunocoloração fraca a nula, tendo uma resposta  
240 semelhante à expressão de ER $\alpha$  para todos os grupos estudados ( $P > 0,05$ ; Fig. 6).

241 Não houve nenhuma diferença entre o grupo pseudogestante e tratados com relação a  
242 espessura da parede uterina; o miométrio apresentou fibras musculares dispostas em várias  
243 direções, estrato vascular evidente e perimétrio formado por tecido conjuntivo frouxo  
244 revestido por mesotélio; o endométrio apresentou pregueamento irregular, revestido por  
245 epitélio simples cilíndrico, lâmina própria com glândulas regulares revestidas por epitélio  
246 simples cilíndrico e o número de glândulas/mm<sup>2</sup> também foi semelhante ( $P > 0,05$ ; Tabela 4).

247

248



#### 249 5.4 Discussão

250 Nosso estudo foi pioneiro na avaliação da expressão dos receptores de progesterona,  
251 estrógeno, andrógeno, hormônio tireoidiano e sistema Kiss/Kiss1R no útero de cadelas  
252 pseudogestante e tratadas com cloridrato de piridoxina e cabergolina, sendo observado  
253 diferentes padrões de imunomarcção dos receptores hormonais avaliados (PR, ER $\alpha$ , AR,  
254 TR $\alpha$ , Kiss/Kiss1R). Foi possível notar que não houve diferença no padrão de imunomarcção  
255 nas diferentes regiões uterinas estudadas para PR, ER $\alpha$  e Kiss1R entre o grupo  
256 pseudogestante e tratado. No entanto, houve aumento de AR na região de ducto glandular nas  
257 cadelas tratadas com piridoxina; maior proporção de TR $\alpha$  na região de ductos glandulares,  
258 glândulas profundas e miométrio nas cadelas pseudogestantes, com redução expressiva na  
259 região de superfície epitelial nas cadelas tratadas com cloridrato de piridoxina e, por fim,  
260 aumento de receptores de Kiss em cadelas pseudogestantes.

261 A imunomarcção de PR com forte intensidade em todas as regiões uterinas no grupo  
262 pseudogestante e tratado demonstrou a importância da progesterona para manutenção das  
263 funções uterinas durante o período de diestro. No final do diestro já foi relatado a presença de  
264 receptores de progesterona com maior intensidade de imunomarcção nas células da região de  
265 estroma comparada com as células epiteliais, indicando que essas células atuam como  
266 mediadores hormonais e controlam o efeito dos hormônios esteroides no sistema genital  
267 feminino (VERMEIRSCH *et al.*, 2000). Além disso, a progesterona autorregula  
268 negativamente a expressão do receptor de progesterona no epitélio endometrial luminal e  
269 glandular superficial (SPENCER *et al.*, 2004). Devido a sua capacidade luteotrófica, a  
270 progesterona é capaz de ativar seus receptores e exercer diferentes atividades sobre regiões de  
271 genes responsivos a progesterona, aumentando ou diminuindo a transcrição dos genes a  
272 depender da disponibilidade de fatores de transcrição em células-alvo (BENETTI;  
273 TONIOLLO; OLIVEIRA, 2003).

274 Houve imunomarcção fraca a nula de receptores de estrógeno  $\alpha$  em todas as regiões  
275 do útero no grupo pseudogestante e tratados com cloridrato de piridoxina e cabergolina. Este  
276 padrão de imunomarcção em útero de cadela na fase de diestro já tinha sido relatado  
277 anteriormente. Na fase de diestro ocorre aumento da concentração de progesterona circulante  
278 e, conseqüentemente, ocorre diminuição dos receptores de estradiol (GOSSLER, 2017)  
279 porque a progesterona regula negativamente os receptores de estradiol no útero (SILVA;  
280 MEIRA, 2014). A concentração de estrógeno circulante no diestro é baixa (BENETTI;

281 TONIOLO; OLIVEIRA, 2003), justificando a reduzida expressão de receptores de  
282 estrógeno no útero das cadelas pseudogestantes, tratadas ou não. Embora, ainda não esteja  
283 bem esclarecido os mecanismos envolvidos na supressão de receptores de estrógeno pela  
284 progesterona (HARALABOS *et al.*, 2006).

285 Em nosso estudo observamos maior expressão de receptores de andrógeno nos ductos  
286 glandulares no grupo tratado com cloridrato de piridoxina. Foi possível observar forte  
287 imunomarcção na região de miométrio. Nossos resultados diferem de outros estudos, em que  
288 foi observado redução na expressão de receptores de andrógenos em macacos tratados com  
289 associação de estrógeno e progesterona (SLAYDEN; BRENNER, 2003). Em mulheres, a  
290 expressão de AR no endométrio é regulada tanto temporal quanto espacialmente durante o  
291 ciclo menstrual normal e a análise detalhada de cortes de tecido uterino de espessura total  
292 identificou fibroblastos estromais endometriais como alvos principais para a ação androgênica  
293 (MARSHALL *et al.*, 2011). Um estudo relatou imunomarcção de AR do estroma uterino de  
294 camundongos no início da gestação e decidualização, mas não foi observado no epitélio  
295 luminal ou glandular (XU *et al.*, 2015). Observamos em nosso estudo um padrão de expressão  
296 semelhante, entretanto, nossos animais encontravam-se em diestro não gestacional. No  
297 miométrio, houve uma expressão moderada no grupo controle. Sugere-se que os andrógenos  
298 são eficientes para as contrações miometriais (MAKIEVA; SAUNDERS; NORMAN, 2014).  
299 Nos casos de pseudogestação em cadelas, as modificações endócrinas são semelhantes ao que  
300 observamos durante a gestação fisiológica, ocorrendo eventos semelhantes ao pré-parto.

301 De uma forma geral, foi possível observar que a proporção de receptores de TR $\alpha$  nas  
302 cadelas psudogestante foi maior quando comparado aos grupos tratados, com redução  
303 significativa na imunomarcção nas células da superfície epitelial no grupo tratado com  
304 cloridrato de piridoxina comparado com a cabergolina. Houve expressiva redução na  
305 proporção de células dos ductos glandulares e glândulas profundas imunomarcadas com TR $\alpha$   
306 no grupo tratado com cloridrato de piridoxina comparado com as cadelas psudogestantes.  
307 Enquanto na região de miométrio a redução expressiva ocorreu com o tratamento com  
308 cabergolina. Em humanos, o endométrio tem demonstrado ser um produtor extratiroidiano de  
309 hormônio T3 e T4 (DETTI *et al.*, 2013). O papel do TR $\alpha$  ainda não está elucidado, no entanto  
310 acredita-se que essa isoforma seja mais abundante na fase secretora do ciclo, em humanos  
311 (AGHAJANOVA *et al.*, 2011). Um estudo com coelhos demonstrou a presença de receptores  
312 de hormônio tireoidiano alfa no útero, nas regiões de endométrio e miométrio no período de  
313 gestação (RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). Além disso, o receptor de hormônio tireoidiano já foi

314 descrito no miométrio e endométrio de macacos (HULCHIY *et al.*, 2012). Em outro estudo  
315 com coelhos, foi observado que fêmeas com hipotireoidismo apresentaram alta expressão de  
316 TR $\alpha$  no útero (RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). Nossos resultados revelaram baixa expressão de  
317 TR $\alpha$  em animais pseudogestantes tratados. É importante ressaltar que a dopamina e o  
318 hormônio liberador de tireotropina (TRH) são importantes na regulação de prolactina  
319 (KOLSTER *et al.*, 2010), por isso, provavelmente, pelos fármacos testados atuarem como  
320 agonistas dopaminérgicos no sistema nervoso central, bloqueiam a síntese e liberação de  
321 prolactina na circulação, revertendo de maneira direta os quadros de hiperprolactinemia e de  
322 forma indireta modificando a expressão de TR $\alpha$  no útero.

323 Este é o primeiro trabalho mostrando a expressão de Kiss/Kiss1R no útero de cadelas  
324 pseudogestante e tratadas. Observamos maior imunomarcagem na superfície epitelial no grupo  
325 controle comparado com o tratado com cabergolina e a Kiss1R apresentou expressão fraca a  
326 nula em todas as regiões uterinas avaliadas tanto nas cadelas pseudogestante quanto nas  
327 tratadas. Nas regiões de glândulas endometriais e miométrio, a kisspeptina foi expressa de  
328 forma moderada igualmente em todos os grupos estudados, enquanto Kiss1R apresentou  
329 marcação nula a fraca. Em humanos, a expressão de Kiss1/Kiss1R está localizada  
330 principalmente em células epiteliais e estromais do útero, mas não do miométrio (CEJUDO  
331 ROMAN *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram encontrados em felinos, em que  
332 detectou-se maior expressão de Kiss1 no útero em diestro enquanto Kiss1R apresentou maior  
333 expressão durante o período de proestro/estro (SANTOS *et al.*, 2021). Foi observado no útero  
334 de cadelas não gestantes após ovulação alta expressão de kisspeptina enquanto que no útero  
335 de cadelas gestante alta expressão de Kiss1R (AMSO; CROW; SHAW, 1994). Dessa forma,  
336 sugere-se que o sistema Kiss/Kiss1R exerce um papel importante no processo de  
337 decidualização (ZHANG *et al.*, 2014), embora, vale ressaltar que as fêmeas avaliadas neste  
338 estudo não desenvolveram uma gestação. Em cães também foi demonstrada expressão de  
339 Kiss/Kiss1R em células ovarianas (CIELESH; MCGRATH; SCOTT, 2017).

340 Em um estudo utilizando células luteais de ratos foi demonstrado que a kisspeptina  
341 promove a secreção de progesterona por essas células por meio do aumento de enzimas  
342 esteroideogênicas (PENG *et al.*, 2013). Na cadela, a luteinização das células começa antes da  
343 ovulação, juntamente com um aumento de secreção de progesterona (CHASTANT-  
344 MAILLARD *et al.*, 2003). Alguns autores sugerem que a kisspeptina tem um papel  
345 importante na secreção de progesterona (GAYTÁN *et al.*, 2009).

346 Observamos em nosso estudo que a imunomarcção de Kiss1R foi fracamente  
347 expressa em todas as regiões uterinas, independente dos grupos tratados. A expressão de  
348 Kiss1R é modulada pela atuação do estrógeno, devido sua ação direta sobre os neurônios  
349 dopaminérgicos. Foi observado que a kisspeptina estimula a secreção de prolactina, mediante  
350 suplementação estrogênica (SZAWKA *et al.*, 2010). Podemos correlacionar essas  
351 informações ao período estral em que as cadelas se encontravam, levando em consideração  
352 que no diestro, as concentrações de estrógeno são mais baixos. Além disso, outro dado do  
353 nosso trabalho que chama atenção foi à baixa expressão dos receptores de estrógeno  
354 semelhantes aos resultados de Kiss1R, reafirmando então as interações endócrinas e  
355 sinérgicas entre o estrógeno e a kisspeptina.

356 As características histomorfométricas estudadas foram semelhantes entre as cadelas  
357 pseudogestante e tratadas, provavelmente em decorrência da fase do ciclo estral, todas em  
358 final de diestro. Os resultados morfométricos se assemelham aos resultados em cadelas  
359 avaliados durante o diestro (MONTEIRO *et al.*, 2009). Durante o diestro o endométrio possui  
360 um padrão histológico na região de superfície epitelial, classificado como simples cilíndrico,  
361 este tipo de epitélio é observado em cadelas múltíparas (GALABOVA *et al.*, 2003),  
362 corroborando com nossos resultados.

363

## 364 **5.5 Conclusões**

365 Nosso estudo demonstrou expressão de receptores de hormônios sexuais, tireoidiano e  
366 do sistema kisspeptina/Kiss1R no útero de cadelas pseudogestante e tratadas com cloridrato  
367 de piridoxina e cabergolina. Mostrou que o padrão de expressão de receptores de andrógeno e  
368 hormônio tireoidiano é diferente entre o grupo tratado com cloridrato de piridoxina e  
369 cabergolina, com possível papel local do andrógeno em ductos glandulares em cadelas  
370 tratadas com cloridrato de piridoxina e do hormônio tireoidiano alfa nas células do epitélio  
371 superficial uterino em cadelas tratadas com cabergolina. Além disso, cadelas que foram  
372 tratadas com cloridrato de piridoxina ou cabergolina apresentaram as mesmas características  
373 histomorfométricas de cadelas pseudogestantes.

374

375

376 **Contribuição dos Autores**

377 Metodologia: Larissa Rodrigues Santana, Raquel Niella Vieira, Luciano Cardoso  
378 Silva. Análise de dados: Larissa Rodrigues Santana, Luciano Cardoso Silva, William Moraes  
379 Machado. Redação do manuscrito: Larissa Rodrigues Santana. Validação e Análise formal:  
380 Paola Pereira das Neves Snoeck, Juneo Freitas Silva.

381 **Agradecimentos**

382 Agradecemos a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), aos laboratórios de  
383 Reprodução Animal, Patologia Veterinária, ao Centro de Microscopia Eletrônica, a Dr<sup>a</sup> Maíra  
384 Corona por contribuir grandemente com a execução da fase experimental de tratamento,  
385 avaliação clínica e procedimentos cirúrgicos das cadelas e por fim, a agência que  
386 disponibilizou a bolsa de estudo FAPESB, permitindo a realização desta pesquisa.

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404 **Tabela 1.** Lista de anticorpos utilizados na imunohistoquímica

Anticorpo	Espécie/clone	Diluição	Tempo de revelação no DAB
<b>Anti-PR</b>	Camundongo/monoclonal	1:2000	20s
<b>Anti-ER<math>\alpha</math></b>	Camundongo/monoclonal	1:50	1h
<b>Anti-AR</b>	Camundongo/policlonal	1:200	20min
<b>Anti-TR<math>\alpha</math></b>	Coelho/Policlonal	1:300	7min
<b>Anti-Kiss1</b>	Camundongo/monoclonal	1:200	5min
<b>Anti-Kiss1R</b>	Coelho/policlonal	1:100	1minuto

405

406 **Tabela 2.** Pontuação proporcional de imunomarcção pela imunohistoquímica

Proporção de imunomarcção (%)	
Escore 0	Nenhum núcleo positivo
Escore 1	Menos de 1% de núcleos positivos
Escore 2	1 a 9% de núcleos positivos
Escore 3	10 a 32% de núcleos positivos
Escore 4	33 a 65% de núcleos positivos
Escore 5	Mais de 65% de núcleos positivos

407 Escala de pontuação imunohistoquímica de acordo com de Vermeirsch et al. (2000).

408

409 **Tabela 3.** Concentrações séricas de PRL em cadelas com pseudociese nos tempos 0h e 120h após  
410 a administração de cloridrato de piridoxina (50mg de B6/kg/dia) ou cabergolina (5 $\mu$ g de  
411 cabergolina /kg/dia)

Tratamento	PRL (ng/mL)	
	Dia 0	120h
<b>Controle</b>	3,1 <sup>A</sup>	3,3 <sup>A</sup>
<b>Piridoxina</b>	1,2 <sup>aB</sup>	<0,6 <sup>Bb</sup>
<b>Cabergolina</b>	3,6 <sup>aA</sup>	<0,6 <sup>bB</sup>

412 <sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma linha indica diferença significativa (P < 0,05).413 <sup>AB</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05)

414

415 **Tabela 4.** Dados histomorfométricos do útero de cadelas pseudogestante e tratadas (médias  $\pm$  EP;  
416 CV)

Grupo	Altura de EL( $\mu$ m)	AlturaEG ( $\mu$ m)	Endométrio ( $\mu$ m)	Miométrio ( $\mu$ m)	Nº de GL/ área (mm <sup>2</sup> )
<b>Controle</b>	14,22 $\pm$ 6,82	1042,20 $\pm$ 312,8	1217,82 $\pm$ 289,66	706,38 $\pm$ 294,76	7,2 $\pm$ 2,18
<b>Piridoxina</b>	14,50 $\pm$ 5,12	906,91 $\pm$ 107,9	1177,55 $\pm$ 184,84	796,08 $\pm$ 265,31	5,4 $\pm$ 0,88
<b>Cabergolina</b>	20,22 $\pm$ 6,24	977,91 $\pm$ 425,4	1133,85 $\pm$ 402,88	749,73 $\pm$ 238,51	6,2 $\pm$ 1,36

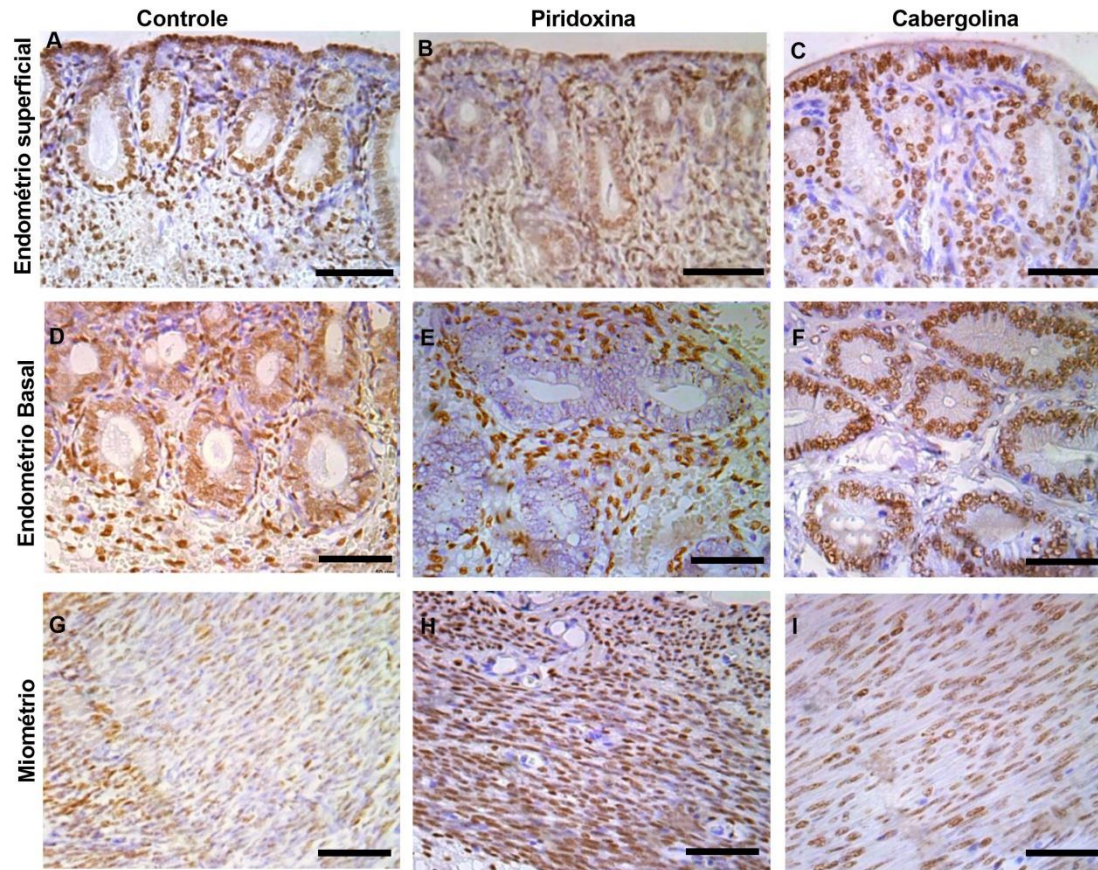
417 Nenhuma diferença entre os grupos experimentais foi encontrada (P &gt; 0,05).

418 EL= epitélio luminal; EG: epitélio glandular; GL= glândulas.

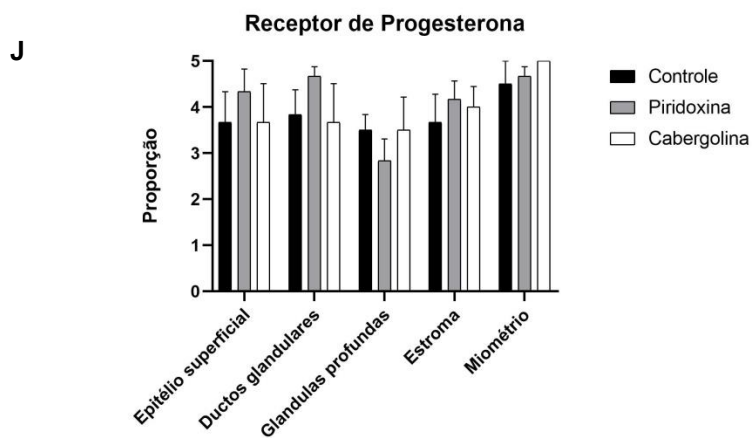
419

420

## Receptor de Progesterona (PR)



421



422

423

424 **Fig 6.** Perfil de expressão do receptor de progesterona no útero de cadelas pseudogestantes ou tratadas.

425

426 A - I) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de PR (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Bar = 50 µm). J) Pontuação proporcional de imunomarcagem no útero de

427

428

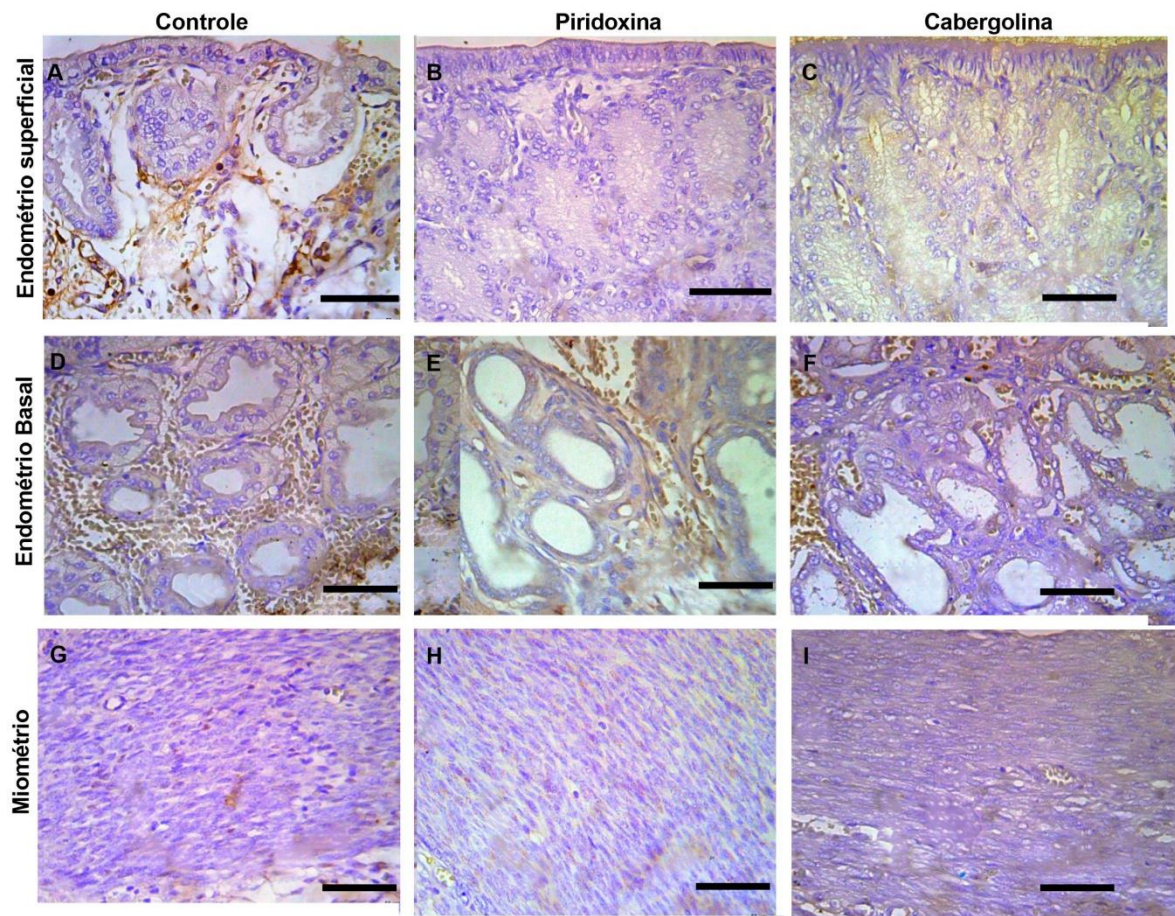
429

430

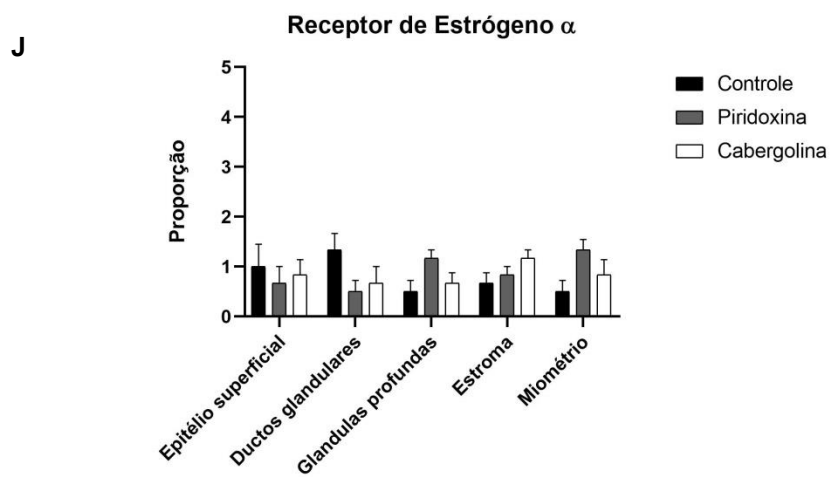
431

432

## Receptor de Estrógeno (ER $\alpha$ )



433

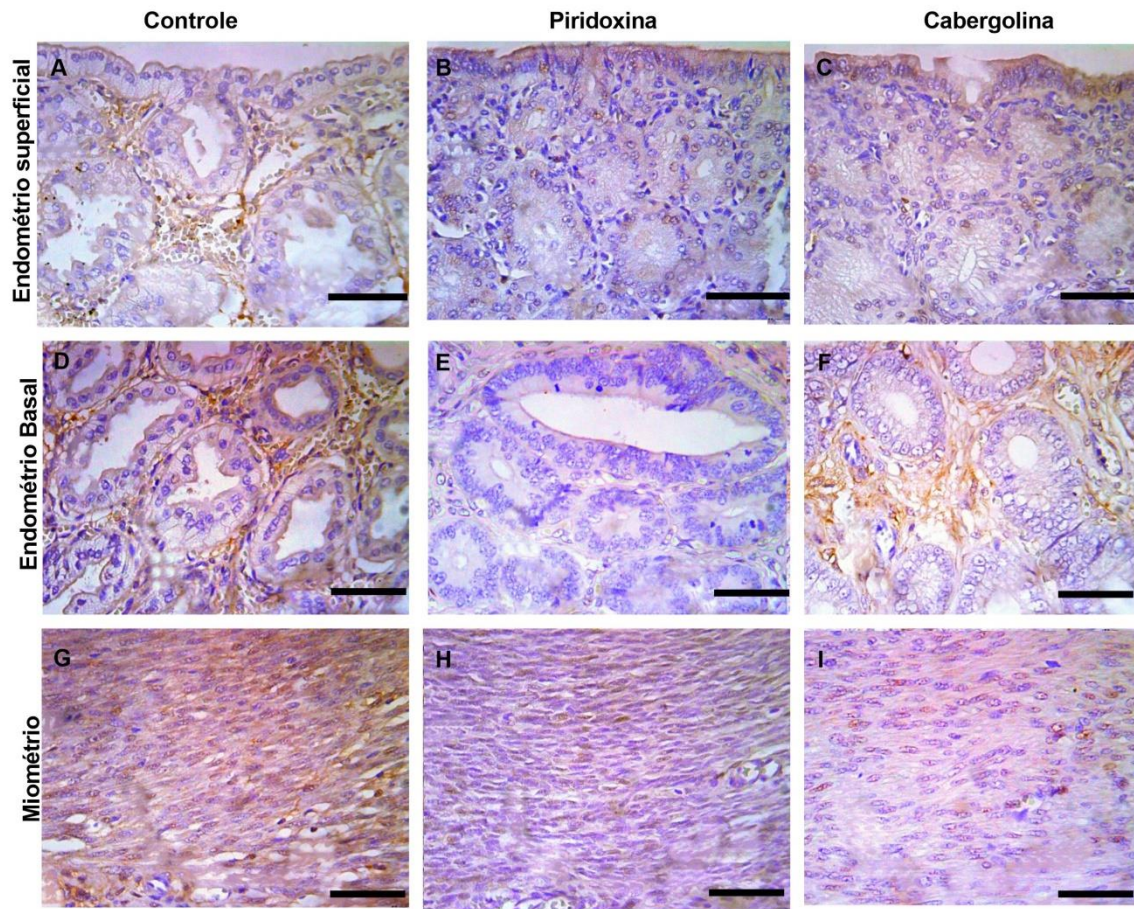


434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443

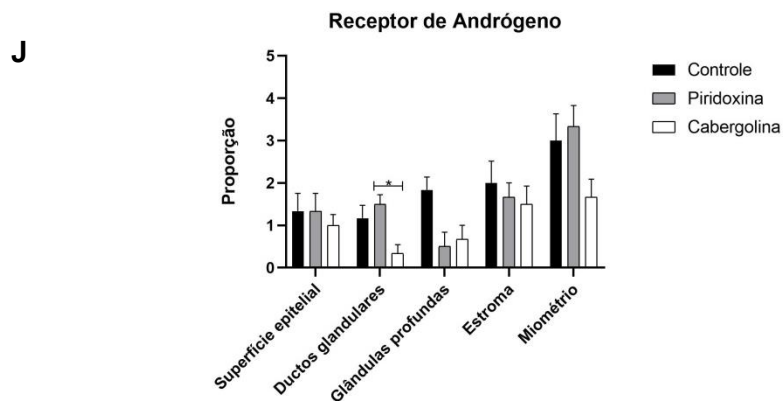
**Fig 7.** Perfil de expressão do receptor de estrógeno  $\alpha$  no útero de cadelas pseudogestante e tratadas. A - I) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de ER $\alpha$  (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Bar = 50  $\mu$ m). J) Pontuação proporcional de imunomarcacão no útero de cadelas pseudogestantes e tratadas (média  $\pm$  SEM; n=6/grupo experimental).



## Receptor de Andr6geno (AR)



444



445

446

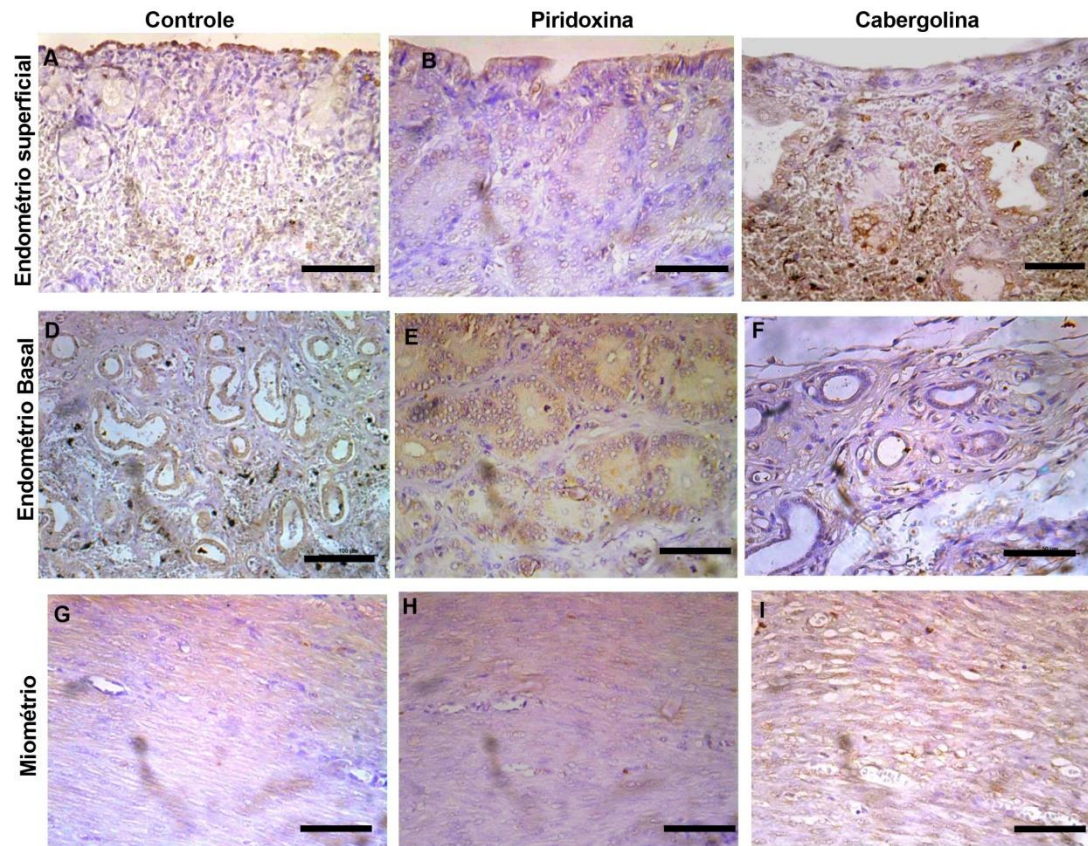
447

448

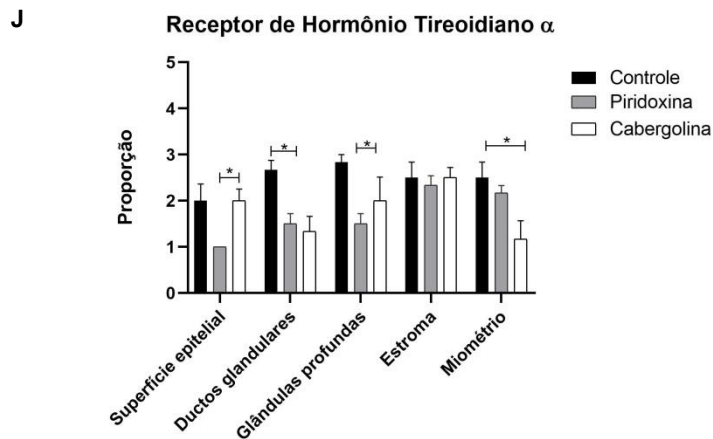
449

**Fig 8.** Perfil de expressão do receptor de andr6geno no útero de cadelas pseudogestante e tratadas. A - I) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de AR (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris , Bar = 50  $\mu$ m). J) Pontuação proporcional de imunomarcacão no útero de cadelas pseudogestantes e tratadas (média  $\pm$  SEM; n=6/grupo experimental).

## Receptor de Hormônio Tireoidiano (TR $\alpha$ )



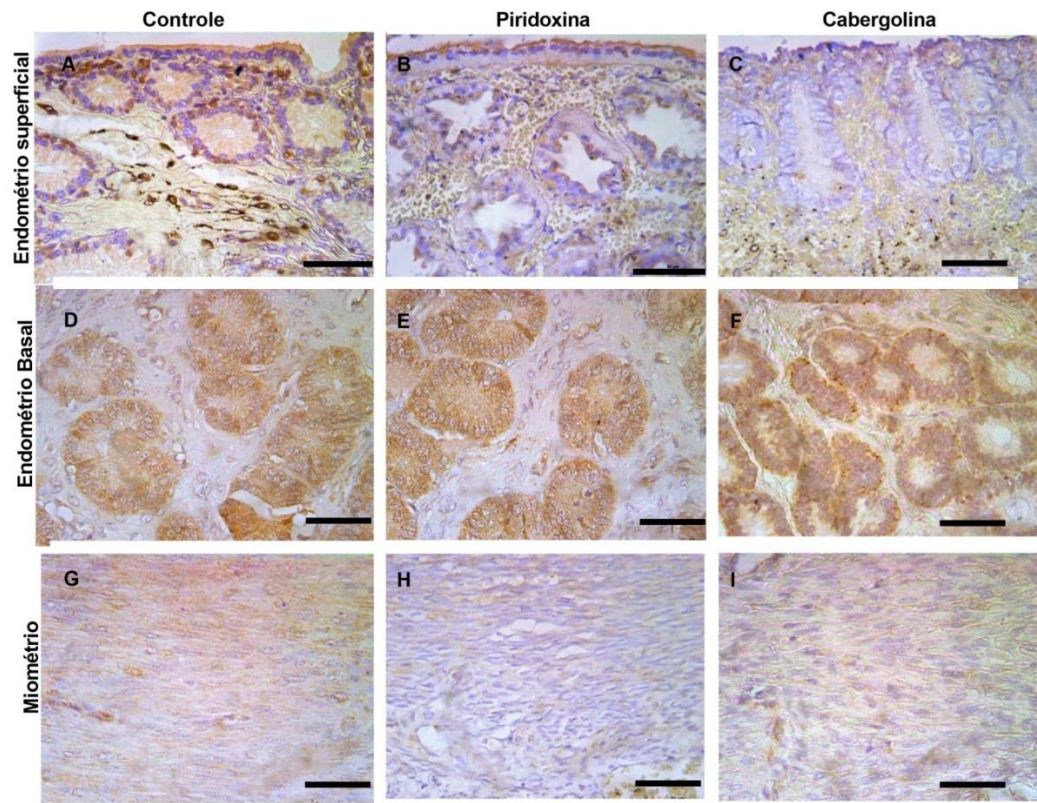
450  
451



452  
453  
454  
455  
456  
457

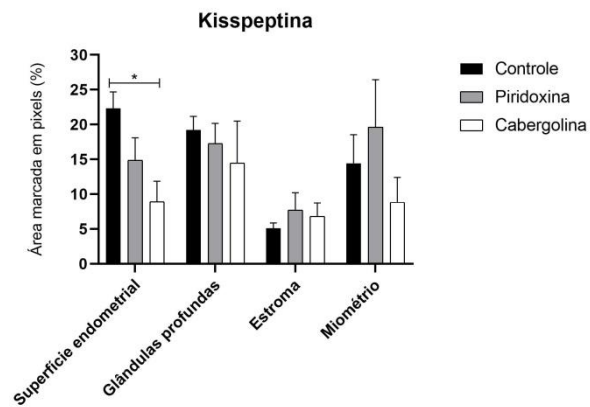
**Fig 9.** Perfil de expressão de hormônio tireoidiano útero de cadelas pseudogestante e tratadas. A - I) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de TR $\alpha$  (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Bar = 50  $\mu$ m). J) Pontuação proporcional de imunomarcagem no útero de cadelas pseudogestantes e tratadas (média  $\pm$  SEM; \*P < 0,05; n=6/grupo experimental).

## Kisspeptina (Kiss)



458

J



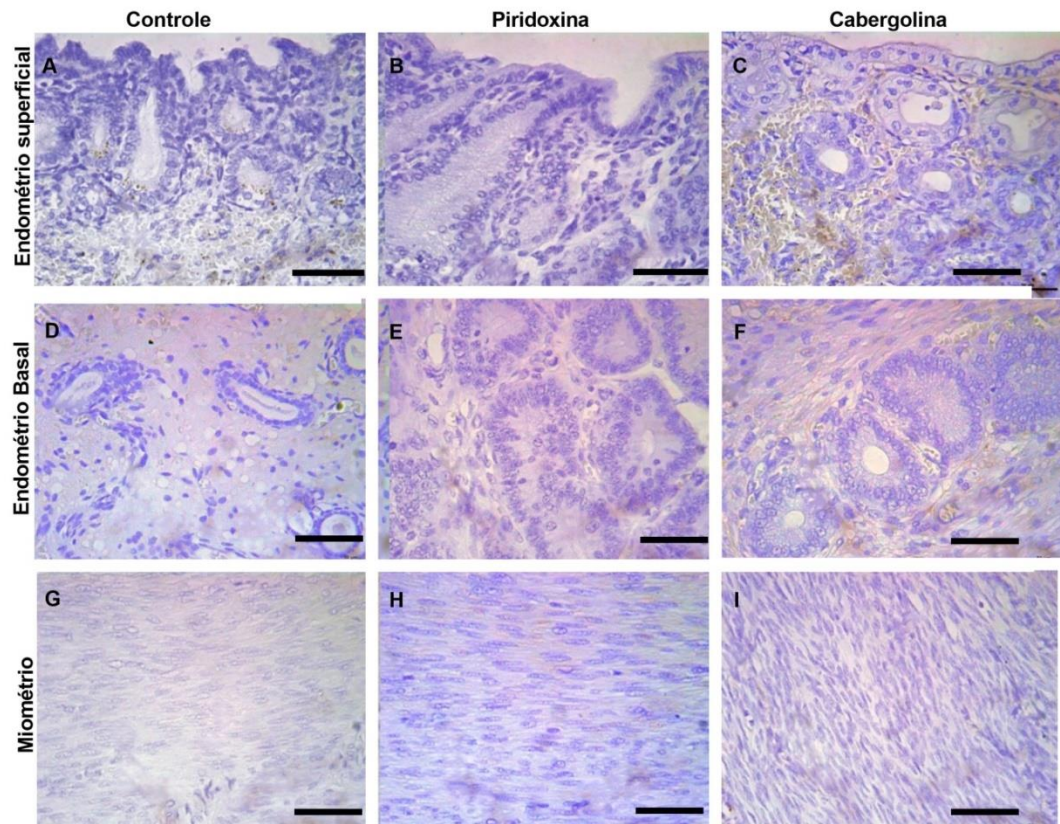
459

460 **Fig 10.** Perfil de expressão de kisspeptina útero de cadelas pseudogestante e tratadas. A - I)  
 461 Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de Kiss (Estreptavidina-biotina-peroxidase;  
 462 Hematoxilina de Harris , Bar = 50  $\mu$ m). J) Pontuação proporcional de imunomarcção no útero de  
 463 cadelas pseudogestantes e tratadas (média  $\pm$  SEM; \*P < 0,05; n=6/grupo experimental).

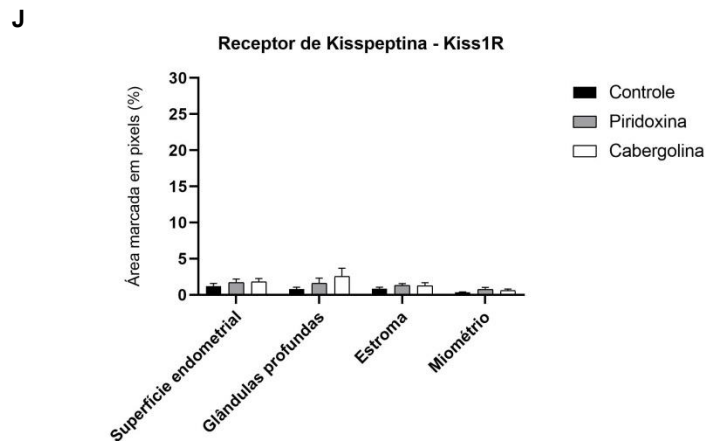
464

465

## Receptor de Kisspeptina (Kiss1R)



466



467

468 **Fig 11.** Perfil de expressão de receptor de kisspeptina no útero de cadelas pseudogestante e tratadas. A  
 469 - I) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de Kiss (Estreptavidina-biotina-peroxidase;  
 470 Hematoxilina de Harris, Bar = 50 μm). J) Pontuação proporcional de imunomarcacão no útero de  
 471 cadelas pseudogestante e tratadas (média ± SEM; n=6/grupo experimental).

## 472 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

473

474 A reprodução de cães é uma especialidade veterinária que vem ganhando grande  
475 destaque dentro da clínica de pequenos animais pela importância que essa espécie apresenta  
476 para a sociedade, são vistos como membros da família, utilizados na segurança e são também  
477 modelos experimentais para experimentos científicos. Dessa forma, o conhecimento do ciclo  
478 estral, bem como a compreensão da fisiopatologia das alterações do sistema reprodutor, nos  
479 ajuda a buscar novos caminhos para o tratamento de distúrbios reprodutivos, como por  
480 exemplo, a pseudogestação.

481 Nossa pesquisa traz de forma inédita, um estudo sobre a ação local de uma substância  
482 segura e eficaz para o tratamento da pseudogestação em cadelas. Demonstramos por meio do  
483 nosso estudo que, a vitamina B6 além de possuir efeitos positivos sobre o controle da  
484 hiperprolactinemia, também modula a expressão de receptores hormonais sem causar  
485 alterações sobre a morfometria uterina, no entanto mais estudos ainda são necessários para  
486 uma melhor compreensão da ação do cloridrato de piridoxina no útero.

487 Como pesquisadora que está iniciando a carreira na pesquisa científica, realizar esse  
488 experimento foi uma experiência de muito aprendizado, crescimento profissional e pessoal.  
489 Com a oportunidade oferecida pelo mestrado, aprendi a desenvolver cada etapa, compreender  
490 os processos bioquímicos e laboratoriais e dominar novas técnicas de biologia molecular,  
491 requisitos importantes que contribuíram para meu crescimento como cientista.

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502 **REFERÊNCIAS**

- 503 AGHAJANOVA, L.; EVERS, A.S.; LINDEBERG, M.; LANDGREN, B.M.; SPARRE, L.S.;  
504 HOVATTA, O. Thyroid-stimulating hormone receptor and thyroid hormone receptors are  
505 involved in human endometrial physiology. **Fertility and Sterility**, v.95, p.230-237, 2011.  
506 doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.079.
- 507 AMSO, N.N.; CROW, J.; SHAW, R.W. Comparative immunohistochemical study of  
508 oestrogen and progesterone receptors in the Fallopian tube and uterus at different stages of the  
509 menstrual cycle and the menopause. **Human Reproduction**, v.9, p.1027- 1037, 1994.  
510 doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138628.
- 511 APPARÍCIO, M.; VICENTE, W.R.R. **Reprodução e obstetrícia de cães e gatos**. São Paulo:  
512 MedVet, 2015.
- 513 AQUINO, N.S.S.; KOKAY, I.C.; PEREZ, C.T.; LADYMAN, S.R.; HENRIQUES, P.C.;  
514 SILVA, J.F.; BROBERGER, C.; GRATTAN, D.R.; SZAWKA, R.E. Kisspeptin stimulation  
515 of prolactin secretion requires Kiss1 receptor but not in tuberoinfundibular dopaminergic  
516 neurons. **Endocrinology**, v.160, p.522–533, 2019. doi.org/10.1210/en.2018-00932.
- 517 ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression.  
518 **Physiological Reviews**, v.81, p.1269-1304, 2001.
- 519 BANKS, W.J. Sistema reprodutor feminino. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São  
520 Paulo: Manole, 1992.
- 521 BENETTI, A.H.; TONIOLLO, G.H.; OLIVEIRA, J.A. Concentrações séricas de  
522 progesterona, 17 b-estradiol e cortisol durante o final do próestro, estro e diestro gestacional  
523 em cadelas. **Ciência Rural**, v.34, p. 471-478, 2004. doi.org/10.1590/S0103-  
524 84782004000200021.
- 525 BOLE-FEYSOT, C.; GOFFIN, V.; EDERY, M.; BINART, N.; KELLY, P.A. Prolactin (PRL)  
526 and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL  
527 receptor knockout mice. **Endocrine Reviews**, v.19, p.225-68, 1998.
- 528 BOONYARATANAKORNKIT, V.; EDWARDS, D.P. Receptor mechanisms mediating non-  
529 genomic actions of sex steroids. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.3, p.139-53, 2007.  
530 doi: 10.1055/s-2007-973427.
- 531 CARDOSO, R.C.S. Infertility in bitches and queens. **Ciência Animal**, v.22, p. 235-247,  
532 2012.
- 533 CARVALHO, A.M.H.; SANTOS, A.D.F.; SILVA, C.M. Indução do estro e métodos para  
534 controle das fases do ciclo estral em cadelas. **Ciência Animal**, v.30, p.117-129, 2020.
- 535 CEJUDO, R.A.; PINTO, F.M.; DORTA, I.; ALMEIDA, T.A.; HERNÁNDEZ, M.;  
536 ILLANES, M.; TENA-SEMPERE, M.; CANDENAS, L. Analysis of the expression of  
537 neurokinin B, kisspeptin, and their cognate receptors NK3R and KISS1R in the human female  
538 genital tract. **Fertility and Sterility**, v.97, p.1213–9, 2012. doi:  
539 10.1016/j.fertnstert.2012.02.021.
- 540 CHATDARONG, S.; KUNKITTI, P.; SRISUWATANASAGUL, S. P. Distribution of  
541 Oestrogen Receptor and Progesterone Receptor and Leukocyte Infiltration in Canine Cervical

- 542 Tissue. In: Proceedings 7th Chulalongkorn **University Veterinary Science** the Animal  
543 Company, v.1, p.58, 2008.
- 544 CHASTANT-MAILLARD, S.; VIARIS DE LESEGNO, C.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE,  
545 S.; MEYLHEUC, T.; FONTBONNE, A.; CHODKIEWICZ, M.; SAINT-DIZIER, M.;  
546 REYNAUD, K. The canine oocyte: uncommon features of in vivo and in vitro maturation.  
547 **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.391-402, 2011. doi: 10.1071/RD10064.
- 548 CHRITIANSEN, I.J. **Reprodução no cão e gato**. São Paulo: Manole, 362p, 1988.
- 549 CIELESH, M.E.; MCGRATH, B.M.; SCOTT, C.J.; NORMAN, S.T.; STEPHEN, C.P. The  
550 localization of kisspeptin and kisspeptin receptor in the canine ovary during different stages of  
551 the reproductive cycle. **Reproduction Domestic Animal**, v.52, p.24-8, 2017.
- 552 CRITCHLEY, H.O.D.; SAUNDERS, P.T.K. Hormone receptor dynamics in a receptive  
553 human endometrium. **Reproductive Science**, v.16,p,191-199, 2009.  
554 doi:10.1177/1933719108331121.
- 555 CONCANNON, P.W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction**  
556 **Science**, v. 124, n. 3, p. 200-210, 2011.
- 557 CONCANNON, P.W.; MCCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of  
558 ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**,  
559 **Supplement**, v. 39, p. 3-25, 1989.
- 560 DELITALA, G.; MASALA, A.; ALAGNA, S.; DEVILLA, L.; Effect of pyridoxine on  
561 human hypophyseal trophic hormone release: a possible stimulation of hypothalamic  
562 dopaminergic pathway. **Journal Clinical Endocrinology Metabolic**, v.42, p.603–606, 1976.
- 563 DETTI, L.; UHLMANN, R.A.; FLETCHER, N.M.; DIAMOND, M.P.; SAED, G.M.  
564 Endometrial signaling pathways during ovarian stimulation for assisted reproduction  
565 technology. **Fertility and Sterility**, v.100, p.889-894,2013.
- 566 DIAGONE, K.V. **Histologia e morfometria do aparelho reprodutor de fêmeas**  
567 **submetidas à ovariosalpingo-histerectomia (Canis familiaris, Linnaeus, 1758)**. 2005. 58f.  
568 Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade  
569 de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2005.
- 570 ETTINGER S.J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1992.
- 571 FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3  
572 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2004.
- 573
- 574 FOUKAS, M.D. An antilactogenic effect of pyridoxine. **Journal of Obstetrics and**  
575 **Gynaecology**, v.80p.718-20,1973. doi: 10.1111/j.1471-0528.1973.tb16057.x.
- 576 GALABOVA, G.; EGERBACHER, M.; AURICH, J.E.; LEITNER, M.; WALTER,  
577 I. Morphological changes of the endometrial epithelium in the bitch during metoestrus and  
578 anoestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 415-420, 2003. doi: 10.1046/j.1439-  
579 0531.2003.00459.x.
- 580 GAYTÁN, F.; GAYTÁN, M.; CASTELLANO, J.M.; ROMERO, M.; ROA, J.; APARICIO,  
581 B.; GARRIDO, N.; SÁNCHEZ-CRIADO, J.E.; MILLAR, R.P.; PELLICER, A.; FRASER,  
582 H.M.; TENA-SEMPERE, M. KISS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in

- 583 human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory  
584 dysfunction. **Journal Physiologic Endocrinology Metabolic**, v.293, p.520-31, 2009. doi:  
585 10.1152/ajpendo.90895.2008.
- 586 GRATTAN, D. 60 Years of neuroendocrinology: the hypothalamo-prolactin axis. **Journal of**  
587 **Endocrinology**, v.226, p.101-122, 2015.
- 588 GIBSON, D.A.; SIMITSIDELLIS, I.; SAUNDERS, P.T.K. Regulation of androgen action  
589 during establishment of pregnancy. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.57, p.35–47,  
590 2016.
- 591 GOBELLO, C.; CONCANNON, P.W.; VERSTEGEN, I.I.I.J.; Pseudopreñez canina: Una  
592 revisión. **Recent Advances in Small Animal Reproduction**. 2001.
- 593 GOBELLO, C. Revisiting canine pseudocyesis. **Theriogenology**, v.167, p.94-98. 2021.  
594 doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.03.014.
- 595 GOSSLER, V. Evaluation off cell proliferation and endometrial thickness of bitches indifferent  
596 periods of diestrus. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.89, p.1719-1727, 2017.  
597 doi.org/10.1590/0001-3765201720150611.
- 598 HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. 582 p.
- 599 HARALABOS, N.V. CONSTANTINOS, M.B.; ALEXANDROS, S.; PHILIPPOS, S.;  
600 ANASTASIA, I.S.; ELIAS, K. Serum estradiol-17 $\beta$ , progesterone and respective uterine  
601 cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra. **Theriogenology**, v.62,  
602 p.614-623, 2004.
- 603 HAMMES, S.R.; LEVIN, E.R. Extra-nuclear steroid receptors: nature and function.  
604 **Endocrine Society**, v.28, p.726–41, 2007. doi: 10.1210/er.2007-0022.
- 605 HAMON, M.; MALLAT, M.; HERBET, A. et al. Metergoline: A new ligand of serotonin  
606 receptors in the rat brain. **Journal Neurochemistry**, v.36, p.613-626, 1981.
- 607 HARRIS, A.R.C.; SMITH, M.S.; ALEX, S. Pyridoxine (B6)-Induced inhibition of prolactin  
608 release in the female rat. **Endocrinology**, v.102,p. 362-366, 1978. doi.org/10.1210/endo-102-  
609 2-362.
- 610 HARVEY, M.A.; CAUVIN, A.; DALE, M.; Lindley, S.; Ballabio, R. Effect and mechanism  
611 of the antiprolactin drug cabergolina on pseudopregnancy in the bitch. **Journal Small**  
612 **Animal Practice**, v.38, p.336-339, 1997.
- 613  
614 HULCHIY, M.; ZHANG, H.; CLINE, J.M.; HIRSCHBERG, A.L.; SAHLIN, L. Receptors  
615 for thyrotropin-releasing hormone, thyroid-stimulating hormone, and thyroid hormones in the  
616 macaque uterus: effects of long-term sex hormone treatment. Menopause. **Journal of the**  
617 **North American Menopause Society**, v.19, p.1253-1259, 2012. doi:  
618 10.1097/gme.0b013e318252e450.
- 619 KIMURA, N.; MIZOKAMI, A.; OONUMA, T.; SASANO, H.; NAGURA, H  
620 Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal anticorpo in parafin-  
621 embedded human tecidos. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.41, p.671-678,  
622 1993.



- 623 KOLSTER, K.A.; PANCIERA, D.L.; PURSWELL, B.J.; VERSTEGEN, J.P. Control of  
624 prolactin secretion in canine hypothyroidism. **Clinical Theriogenology**, v.2, p.185-190, 2010.
- 625 KOTANI, M.; DETHEUX, M.; VANDENBOGAERDE, A.; COMMUNI, D.;  
626 VANDERWINDEN, J.M.; POUL, E.LE.; BRÉZILLON, S.; TYLDESLEY, R.; SUAREZ-  
627 HUERTA, N.; VANDEPUT, F.; BLANPAIN, C.; SCHIFFMANN, S.N.; VASSART, G.;  
628 PARMENTIER, M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural  
629 ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **Journal of Biological Chemistry**,  
630 v.276, p.34631–34636, 2001.
- 631 KUIPER, G.G.; FABER, P.W.; VAN ROOIJ, H.C.; VAN DER KORPUT, J.A.; RIS-  
632 STALPERS, C.; KLAASSEN, P.; TRAPMAN, J. BRINKMANN, A.O. Structural  
633 organization of the human androgen receptor gene. **Journal of Molecular Endocrinology**,  
634 1989.
- 635 KUSUMA, P.S.H.; TAINTURIER, D. Comparison of induction of oestrus in dogs using  
636 metergoline, metergoline plus human chorionic gonadotrophin, or pregnant mares' serum  
637 gonadotrophin. **Journal Reproduction Fertility Supplement**, n.47, p.363-370, 1993.
- 638 JANSSENS, L.A. Treatment of pseudopregnancy with bromocriptin, an ergot alkaloid. **The**  
639 **Veterinary Record**, v. 119, p. 172-174, 1986.
- 640 JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and Feline**  
641 **Theriogenology**. 19 Philadelphia: Saunders; 2001.
- 642 LEVIN, E.R.; HAMMES, S.R. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling  
643 by steroid receptors. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v.12, p.783-797, 2016. doi:  
644 10.1038/nrm.2016.122.
- 645 MAKIEVA, S.; SAUNDERS, P.T.K.; NORMAN, J.E. Androgens in pregnancy: roles in  
646 parturition. **Human Reproduction Update**, n. 20, p.542–559, 2014.
- 647 MARINKOVIĆ, D.; ANIČIĆ, M.; VAKANJAC, S.; NEDIC, V. Morphological  
648 characteristics and expression of estrogen and progesterone receptors in the canine  
649 endometrium during the estrus cycle, cystic endometrial hyperplasia and pyometra. **Acta**  
650 **Veterinaria-Beograd**, v. 68, p. 239-250, 2018.
- 651 MARSHALL, E.; LOWREY, J.; MACPHERSON, S.; MAYBIN, J.A.; COLLINS, F.;  
652 CRITCHLEY, H.O.; SAUNDERS, P.T. In silico analysis identifies a novel role for androgens  
653 in the regulation of human endometrial apoptosis. **Journal of Clinical Endocrinology**  
654 **Metabolism**, v.96, p. E1746-55, 2011. doi: 10.1210/jc.2011-0272.
- 655 MARTINS, L.R.; LOPES, M.D. Pseudociese canina. **Revista Brasileira de Reprodução**  
656 **Animal**, v. 29, p.137-141, 2005.
- 657 MARTINS, B.B. **Atividade secretória e histologia uterina de cadelas prépuberes com**  
658 **ablação parcial do desenvolvimento das glândulas endometriais**. 2013. 51p. Dissertação  
659 (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do  
660 Espírito Santo, 2013.
- 661 MONTEZANO, A.C.I.; TOSTES, R.C.A. Receptores nucleares, receptores de membrana e  
662 mensageiros secundários. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, p.84-88, 2005.

- 663 MERTENS, H.J.; HEINEMAN, M.J.; THEUNISSEN, P.H.; DE JONG, .FH.; EVERS, J.L.;  
 664 Androgen, estrogen and progesterone receptor expression in the human uterus during the  
 665 menstrual cycle. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive**  
 666 **Biology**, v.98, p.58–65, 2001.
- 667 MIALOT, J.P.; BEGON, D.; GUERIN, C. Pathologie de la reproduction chez les carnivores  
 668 domestiques. **Le Point Vétérinaire**, p.143-158, 1984.
- 669 MONTEIRO, C. M. R.; PERRI, S.H.V.; CARVALHO, R.G.; KOIVISTO, M.B.; Histologia e  
 670 morfometria em cornos uterinos de cadelas nulíparas, múltíparas e tratadas com  
 671 contraceptivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 847-851, 2009.  
 672
- 673 NANJAPPA, M.K.; MESA, A.M.; TEVOSIAN, S.G.; DE ARMAS, L.; HESS, R.A.;  
 674 BAGCHI, I.C.; COOKE, P.S. Membrane estrogen receptor1 is required for normal  
 675 reproduction in male and female mice. **Journal Endocrinology and Reproduction**, v.21,  
 676 p.1-14, 2017. PMID: 34321782; PMCID: PMC8315114.
- 677 NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4ed. Rio de  
 678 Janeiro: Elsevier, 2010.
- 679 ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J.P. Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in  
 680 pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches. **Journal Reproduction**  
 681 **Fertility**, n.51,p.203-208, 1997.
- 682 OLIVEIRA, E.C.S.; MARQUES JÚNIOR, A.P.; NEVES, M.M. Reproductive endocrinology  
 683 and fertility control in bitches a review. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, p. 1-12, 2003.
- 684 OKKENS, A.C.; DIELEMAN, S.J.; KOOISTRA, H.S.; BEVERS, M.M. Plasma  
 685 concentrations of prolactin in overtly pseudopregnant Afghan hounds and the effect of  
 686 metergoline. **Journal Reproduction Fertility**, v.51, p.295-301, 1997.
- 687 NASCIMENTO, A.S. **Interações dos receptores nucleares com seus ligantes: estudos**  
 688 **estruturais do receptor de hormônio tireoideano, do receptor de mineralocorticoide e do**  
 689 **receptor ativado por proliferadores peroxissomais**. 2009. Tese (Doutorado em Física  
 690 Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- 691 NASCIMENTO, F. E.; SANTOS, R. L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**.  
 692 2ª Ed. Rio de Janeiro:Guanabara-Koogan. 2003
- 693 NARVEKAR, N.; CAMERON, S.; CRITCHLEY, H.O.D.; LIN, S.; CHENG, L.; BAIRD,  
 694 D.T. Low-dose mifepristone inhibits endometrial proliferation and up-regulates androgen  
 695 receptor. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.89, p.2491–2497, 2004.
- 696 PENG, J.; TANG, M.; ZHANG, B.; ZHANG, P.; ZHONG, T.; ZONG, T.; YANG, B.;  
 697 KUANG, H. Kisspeptin. stimulates progesterone secretion via the Erk1/2 mitogen-activated  
 698 protein kinase signaling pathway in rat luteal cells. **Fertility and Sterility**, v.99, p.1436-43,  
 699 2013. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.008.
- 700 PRIEDKALNS, J. Sistema reprodutor feminino. **Histologia Veterinária**. Zaragoza: Acribia,  
 701 1982.
- 702 RAMOS, J.L.G.; CUNHA,I.C.N.; CARVALHO, E.C.Q.; SHIMODA, E.; LUZ, M.R. Análise  
 703 histomorfométrica do útero na espécie canina do nascimento aos seis meses de idade.  
 704 **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinário e Zootecnia**, v.67, p.41-48, 2015.

- 705 RIBEIRO, A.B.; LEITE, C.M.; KALIL, B.; FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A.;  
 706 SZAWKA, R.E.; Kisspeptin regulates tuberoinfundibular dopaminergic neurones and  
 707 prolactin secretion in an oestradiol-dependent manner in male and female rats. **Journal of**  
 708 **Neuroendocrinology**, v.27, p 88-99, 2015. doi.org/10.1111/jne.12242.
- 709 RIBEIRO, A.A. **Dinâmica dos fatores angiogênicos em corpos lúteos de cadelas gestantes**  
 710 **e pseudogestantes**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de  
 711 Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de  
 712 Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Botucatu –SP., 59p, 2018.
- 713 RODRÍGUEZ-CASTELÁN, J.; HERNÁNDEZ, A.A.; TEPEPA, M.M.; M, GÓMEZ, M.M.;  
 714 CASTELÁN, F.; ROMERO, C. E. Distribution of thyroid hormone and thyrotropin receptors  
 715 in reproductive tissues of adult female rabbits. **Endocrine Research**, v.42, p.59-7, 2017.
- 716 RODRÍGUEZ-CASTELÁN, J.; DEL MORAL-MORALES, A.; PIÑA-MEDINA, A.G.;  
 717 ZEPEDA-PÉREZ, D.; CASTILLO-ROMANO, M.; MÉNDEZ-TEPEPA, M.; ESPINDOLA-  
 718 LOZANO, M.; CAMACHO-ARROYO, I.; CUEVAS-ROMERO, E. Hypothyroidism  
 719 induces uterine hyperplasia and inflammation related to sex hormone receptors expression in  
 720 virgin rabbits. **Life Sciences**, v.230, p.111-120, 2019. doi: 10.1016/j.lfs.2019.05.063.
- 721 RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, J. L. Endocrinologia reprodutiva da cadela. **Clínica**  
 722 **Veterinária**, v. 40, p. 50-58, 2002.
- 723 ROSEWEIR, A.K.; MILLAR, R.P. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin  
 724 secretion. **Human Reproduction Update**, v.15, p. 203-212.  
 725 doi.org/10.1093/humupd/dmn058
- 726 ROOT, A.L.; PARKIN, T.D.; HUTCHISIN, P.; WARNES, P.; YAM, P.S. Canine  
 727 pseudopregnancy: an evaluation of prevalence and current treatment protocols in the UK.  
 728 **BMC Veterinary Research**, v.14, p.170, 2018.
- 729 SAMPAIO NETO, L.F.R.; FERRO, M.C.; GARCIA, L.D.; RIBEIRO, B.C. Receptores de  
 730 progesterona e estradiol e Ki-67 no estroma e no epitélio de endometriose superficial e  
 731 profunda. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.56, p.1-6, 2020.
- 732 SANDERS, S.L.; STOUFFER, R.L.; BRANNIAN, J.D. Androgen production by monkey  
 733 luteal cell subpopulations at different stages of the menstrual cycle. **Journal Clinical**  
 734 **Endocrinology Metabolism**, v.2, p.591-6, 1996.
- 735 SANTOS, N.D.; LEAL, D.G. Aspectos fisiológicos da gestação em cadelas. **Simpósio de**  
 736 **trabalhos de conclusão de curso e Seminário de iniciação científica**, v.1, p.1285-1290,  
 737 2017.
- 738 SANTOS, L.C.; ANJOS, C.J.M.; SILVA, S.L.; SANTANA, L.R.; SANTOS, B.R.;  
 739 BARBOSA, E.M.; SILVA, T.Q.M.; CORRÊA, J.M.X.; LAVOR, M.S.L.; SILVA, E.B.;  
 740 MELO, O.N.; SERAKIDES, R.; SILVA, J.F. Pyometra and estrous cycle modulate the  
 741 uterine expression of the kisspeptin system and angiogenic and immune factors in cats.  
 742 **Biology of Reproduction**, v.104, p. 548–561, 2021. doi: 10.1093/biolre/ioaa229.
- 743 SCHÄFER-SOMI, S.; KAYA, D.; SÖZMEN, M.; BECERIKLISOY, H.B.; AĞAOĞLU,  
 744 A.R.; FINDIK, M.; VAN HAEFTEN, T.; ASLAN, S. Kisspeptin-10 and the G protein-  
 745 coupled receptor 54 are differentially expressed in the canine pregnant uterus and tr ophoblast  
 746 cells. **Reproduction in Domestic Animals**,v.52, p.123-129, 2016. doi: 10.1111/rda.12818.

- 747 SHIINA,H.;MATSUMOTO,T.; SATO,T.; IGARASHI,K.; MIYAMOTO,J.; TAKEMASA,  
748 S.; SAKARI,M.; TAKADA, I.; NAKAMURA, T.; METZGER, D.; CHAMBON, P.;  
749 KANNO, J.; YOSHIKAWA, H.; KATO, S. Premature ovarian failure in androgen receptor-  
750 deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p.224-9, 2006.
- 751 SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; BAZER, F.W. Progesterone and  
752 placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. **Biology of**  
753 **Reproduction**, v.71, p.2-10, 2004.
- 754 SZAWKA, R. E.; RIBEIRO, A.B.; LEITE, C.M.; HELENA, C.V.V.; FRANCI, C.R.;  
755 ANDERSON, G.M.; HOFFMAN, G.E.; FRANCI, J.A. Kisspeptin Regulates Prolactin  
756 Release through Hypothalamic Dopaminergic Neurons. **Endocrinology**, v.151,p.3247–3257,  
757 2010. doi: 10.1210/en.2009-1414.
- 758 SILVA, E.S.M.; MEIRA, C. Expressão endometrial de receptores de estradiol e progesterona  
759 em éguas cíclicas, gestantes e acíclicas tratadas com hormônios esteroidais. **Revista**  
760 **Científica de Medicina Veterinária**, n.22, 2014.
- 761 SILVA, M.C.; GUEDES, P.E.B.; SILVA, F.L.; SNOECK, P.P.N. Use of pyridoxine  
762 hydrochloride in the interruption of lactation in female dogs with pseudopregnancy. **Animal**  
763 **Reproduction**, v.18, n.1, p.1-7, 2021. doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0062.
- 764 SILVA, J.F.; OCARINO, N.M.; SERAKIDES, R. Thyroid hormones and female  
765 reproduction. **Biology of Reproduction**, v.99, p.907–921,2018.
- 766 SLAYDEN, O.D.; NAYAK, N.R.; KEVIN A. BURTON, KRISTOF CHWALISZ,  
767 SHARON T. CAMERON, CRITCHLEY, H.O.D.; BAIRD,D.T.; BRENNER, R;M;  
768 Progesterone antagonists androgen receptor expression in the rhesus macaque and human  
769 endometrium. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, p.2668-2679, 2001.
- 770 SCHÄFER-SOMI, S.; AY, S.S.; KAYA, D.; SOZMEN, M.; BECERIKLISOY, H.B.;  
771 AGAOGLU, A.R.; FINDIK, M.; VAN HAEFTEN, T.; ASLAN, S. Kisspeptin-10 and the G  
772 protein-coupled receptor 54 are differentially expressed in the canine pregnant uterus and  
773 trophoblast cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, p.123-129, 2016.
- 774 STABENFELDT, H.G.; EDQVIST, E.L. Processos reprodutivos na fêmea. In: Swenson,  
775 J.M.; Reece, O.W. **Fisiologia dos animais domésticos** 11º edição Rio de Janeiro, 1996.
- 776 TANYAPANYACHON, P.; AMELKINA, O.; CHATDARONG, K. The expression of  
777 kisspeptin and its receptor in the domestic cat ovary and uterus in different stages of the  
778 ovarian cycle. **Theriogenology**, v.117, p.40-48, 2018.
- 779 VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; LAUWERS, H.; CORYN, M. Immunohistochemical  
780 detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone  
781 levels. **Theriogenology**, v.51, p.729-43, 1999.
- 782 VERMEIRSCH H, SIMOENS PA, HELLEMANS M, LAUWERSL H.  
783 Immunohistochemical detection of progesterone receptors in the canine uterus and their  
784 relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v.53, p.773-788, 2000.
- 785 VERMEIRSCH, H.; BROECK, W.; CORYN, M.; SIMOENS, P. Immunohistochemical  
786 detection of androgen receptors in the canine uterus throughout the estrous cycle.  
787 **Theriogenology**, v.57, p.2203–16, 2002.

- 788 XU, J.; LI, M.; ZHANG, L.; XIONG, H.; LAI, L.; GUO, M.; ZONG, T.; ZHANG, D.;  
789 YANG, B.; WU, L.; TANG, M.; KUANG, H. Expression and regulation of androgen receptor  
790 in the mouse uterus during early pregnancy and decidualization. **Molecular Reproduction e**  
791 **Development**, v.82, p.898-906, 2015. doi: 10.1002/mrd.22532.
- 792 ZHANG, P.; TANG, M.; ZHONG, T.; LIN, Y.; ZONG, T.; ZHONG, C.; ZHANG, B.P.;  
793 REN, M.; KUANG, H. Expression and function of kisspeptin during mouse decidualization.  
794 **Plos One**, v.5, p.e97647, 2014. doi.org/10.1371/journal.pone.0097647
- 795 WEBER, A. F. Pseudopregnancy In Dogs. **Iowa State University Veterinaria**, v.7,p. 32–38,  
796 1944.
- 797 YAMADA, S.; UENOYAMA, Y.; KINOSHITA, M.; IWATA, K.; TAKASE, K.; MATSUI,  
798 H. Inhibition of metastin (kisspeptin-54)-GPR54 signaling in the arcuate nucleusmedian  
799 eminence region during lactation in rats. **Endocrinology**, v.148,p.2226-2232, 2007.  
800 doi.org/10.1210/en.2006-1529.
- 801  
802

803

ANEXO – Normas da revista científica *Theriogenology***THERIOGENOLOGY**

806

An International Journal of Animal Reproduction

807

**AUTHOR INFORMATION  
PACK**

808

---

 809 TABLE OF  
810 CONTENTS

811

- 812 ● **Description** p.1
- 813 ● **Audience** p.1
- 814 ● **Impact Factor** p.1
- 815 ● **Abstracting and Indexing** p.1
- 816 ● **Editorial Board** p.2 • **Guide for Authors** p.3
- 817



ISSN: 0093-691X

818

## DESCRIPTION

819

---

820 *Theriogenology* provides an international forum for researchers, clinicians, and industry professionals  
821 in **animal reproductive biology**. This acclaimed journal publishes articles on a wide range of topics  
822 in **reproductive and developmental biology**, of domestic mammal, avian, and aquatic species as well  
823 as wild species which are the object of veterinary care in research or conservation programs.

824

## AUDIENCE

825

---

 826 Individuals involved in animal reproduction biology.

827

## IMPACT FACTOR

828

---

 829 2019: 2.094 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

830

## ABSTRACTING AND INDEXING

831



- 832 Focus on: Veterinary Science and Medicine
- 833 AGRICOLA
- 834 CAB International
- 835 Global Health (Index Veterinarius, Veterinary Bulletin)
- 836 PubMed/Medline
- 837 BIOSIS Citation Index
- 838 Chemical Abstracts
- 839 Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental Sciences
- 840 Elsevier BIOBASE
- 841 Science Citation Index
- 842 Derwent Biotechnology Abstracts
- 843 Scopus
- 844 EDITORIAL BOARD
- 845 

---
- 846 *Editor-in-Chief*
- 847 **F. Gandolfi**, University of Milan, Department of Agricultural and Environmental Sciences - Production, Landscape,  
848 Agroenergy, Milano, Italy
- 849 *Associate Editors*
- 850 **L. Brito**, WI, United States
- 851 **M-A. Driancourt**, Astek, Boulogne Billancourt, France
- 852 *Editorial Board*
- 853 **J. F. Asturiano**, Polytechnic University of Valencia, Valencia, Spain
- 854 **C. Aurich**, University of Veterinary Medicine Vienna, Wien, Austria
- 855 **M.R. Bakst**, USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland, United States
- 856 **I. Barrier Battut**, National Professional School of Haras, Exmes, France
- 857 **A. Blitek**, Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Department of Hormonal  
858 Action Mechanisms, Olsztyn, Poland
- 859 **Boni**, University of Basilicata, Potenza, Italy
- 860 **Chastant**, National Veterinary School Toulouse, Toulouse, France
- 861 **P. Comizzoli**, Smithsonian's National Zoo & Conservation Biology Institute, Washington, District of Columbia, United  
862 States
- 863 **R.A. Dailey**, West Virginia University, Morgantown, West Virginia, United States of America

- 864 **S. Eghbalsaied**, Islamic Azad University Isfahan Branch, Department of Animal Science, Isfahan, Iran, Islamic Republic of
- 865 **F.C. Gwazdauskas**, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, United States
- 866 **S. Hocht**, Shinshu University - Ueda Campus, Ueda, Japan
- 867 **R. Kasimanickam**, Washington State University, Pullman, Washington, United States
- 868 **K. Kikuchi**, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan
- 869 **A. K. McNeel**, Zoetis Genetics, Kalamazoo, Michigan, United States
- 870 **A. Menchaca**, Institute of Animal Reproduction of Uruguay, Montevideo, Uruguay
- 871 **S. Nagy**, Pannon University Department of Animal Sciences, Keszthely, Hungary
- 872 **C.E. Pope**, Audubon Nature Institute, New Orleans, Louisiana, United States
- 873 **V. H. Rao**, Sri Venkateswara Veterinary University, Tirupati, India
- 874 **J. Roca**, University of Murcia, Department of Medicine and Animal Surgery, Murcia, Spain
- 875 **M. Sharafi**, Tarbiat Modares University, Department of Animal Science, Tehran, Iran, Islamic Republic of
- 876 **A. Snider**, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, Nebraska, United States
- 877 **N. Songsasen**, Smithsonian Conservation Biology Institute, Front Royal, United States
- 878 **L. Spicer**, Oklahoma State University, Department of Animal and Food Sciences, Stillwater, Oklahoma, United States
- 879 **R. Ungerfeld**, University of the Republic, Department of Veterinary Biosciences, Montevideo, Uruguay
- 880 **B. K. Whitlock**, The University of Tennessee Knoxville Institute of Agriculture, Knoxville, Tennessee, United States
- 881 **M. Yeste**, University of Girona, Girona, Spain

## 882 GUIDE FOR AUTHORS

883

---

### 884 *Introduction*

885 Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper  
 886 to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to  
 887 ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

### 888 *Aims and Scope*

889 *Theriogenology* is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of  
 890 reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology*  
 891 publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered  
 892 for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or  
 893 in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

### 894 *Types of Articles*

895 *Original Research Papers* should report the results of original research. The material should not have  
 896 been previously published elsewhere, except in a preliminary form.



897 *Review Articles* should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest.  
 898 They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

899 *Letters to the Editor* offering comment or useful critique on material published in the journal are  
 900 welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors. It is hoped that the  
 901 publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the  
 902 journal and its readers.

903 *Page charges*

904 This journal has no page charges.

905 **Submission Checklist**

906 You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for  
 907 review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

908 **Ensure that the following items are present:**

909 One author has been designated as the corresponding author with contact details:

910 E-mail address

911 Full postal address

912 All necessary files have been uploaded: *Manuscript*:

913 It is recommended that the manuscript should be submitted in Word document

914 Include keywords

915 All figures (include relevant captions)

916 All tables (including titles, description, footnotes)

917 Ensure all figure and table citations in the text match the files provided

918 Indicate clearly if color should be used for any figures in print

919 **Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)**

920 *Supplemental files* (where applicable)

921 Further considerations

922 Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

923 All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

924 Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including  
 925 theInternet)

926 A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare

927 Journal policies detailed in this guide have been reviewed

928 Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

929 For further information, visit our [Support Center](#).

930 BEFORE YOU BEGIN

931 *Ethics in publishing*

932 Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal](#)  
933 [publication](#).

934 Studies in humans and animals

935 If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has  
936 been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#)  
937 (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the  
938 [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical](#)  
939 [Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per  
940 those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

941 Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for  
942 experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

943 All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in  
944 accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU](#)  
945 [Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care  
946 and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should  
947 clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be  
948 indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

949 Declaration of interest

950 All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations  
951 that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests  
952 include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent  
953 applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two  
954 places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or  
955 the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this:  
956 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is  
957 accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of  
958 the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that  
959 the information matches. [More information](#).

960 Submission declaration and verification

961 Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in  
962 the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent](#)  
963 [publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its  
964 publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the  
965 work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in  
966 English or in any other language, including electronically without the written consent of the

967 copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service  
968 [Crossref Similarity Check](#).

#### 969 Preprints

970 Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#).  
971 Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple,](#)  
972 [redundant or concurrent publication](#)' for more information).

#### 973 Use of inclusive language

974 Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences,  
975 and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or  
976 commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to  
977 another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health  
978 condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias,  
979 stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek  
980 gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to  
981 avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to  
982 personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health  
983 condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help  
984 identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

#### 985 Author contributions

986 For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual  
987 contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal  
988 analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources;  
989 Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review &  
990 editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s)  
991 following. [More details and an example](#)

#### 992 Authorship

993 All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and  
994 design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article  
995 or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be  
996 submitted.

#### 997 Changes to authorship

998 Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their  
999 manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any  
1000 addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before**  
1001 the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a  
1002 change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the  
1003 change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with  
1004 the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes  
1005 confirmation from the author being added or removed.

- 1006 Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of  
1007 authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of  
1008 the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any  
1009 requests approved by the Editor will result in a corrigendum.
- 1010 Copyright
- 1011 Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see  
1012 [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the  
1013 manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this  
1014 agreement.
- 1015 Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal  
1016 circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution  
1017 outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If  
1018 excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from  
1019 the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by  
1020 authors in these cases.
- 1021 For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a  
1022 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is  
1023 determined by the author's choice of [user license](#).
- 1024 Author rights
- 1025 As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More](#)  
1026 [information](#).
- 1027 *Elsevier supports responsible sharing*
- 1028 Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.
- 1029 Role of the funding source
- 1030 You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or  
1031 preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in  
1032 the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to  
1033 submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be  
1034 stated.
- 1035 Open access
- 1036 Please visit our [Open Access page](#) for more information.
- 1037 Elsevier Researcher Academy
- 1038 [Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career  
1039 researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers  
1040 several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the  
1041 process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to  
1042 improve your submission and navigate the publication process with ease.

1043 Language (usage and editing services)

1044 Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of  
1045 these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible  
1046 grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English](#)  
1047 [Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

1048 Submission

1049 Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details  
1050 and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-  
1051 review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final  
1052 publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for  
1053 revision, is sent by e-mail.

1054 *Submit your article*

1055 Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/therio/default.aspx>.

1056 Referees

1057 Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more  
1058 details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the  
1059 suggested reviewers are used.

1060 PREPARATION

1061 **Use of word processing software**

1062 It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should  
1063 be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes  
1064 will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's  
1065 options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts,  
1066 superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each  
1067 individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.  
1068 The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see  
1069 also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics  
1070 will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic  
1071 artwork.

1072 To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check'  
1073 functions of your word processor.

1074 *Pages and lines should be numbered.*

1075 Article structure

1076 Subdivision - numbered sections

1077 Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1  
1078 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering  
1079 also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief  
1080 heading. Each heading should appear on its own separate line.

1081 Introduction

1082 State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature  
1083 survey or a summary of the results.

1084 Material and methods

1085 Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods  
1086 that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly  
1087 from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications  
1088 to existing methods should also be described.

1089 *Results*

1090 Results should be clear and concise.

1091 Discussion

1092 This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results  
1093 and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published  
1094 literature.

1095 Conclusions

1096 The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand  
1097 alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

1098 Essential title page information

1099 **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid  
1100 abbreviations and formulae where possible.

1101 **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each  
1102 author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in  
1103 your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the  
1104 actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter  
1105 immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal  
1106 address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each  
1107 author.

1108 **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing  
1109 and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about  
1110 Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are**  
1111 **kept up to date by the corresponding author.**

1112 **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done,  
1113 or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote  
1114 to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the  
1115 main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

1116 Highlights

1117 Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of  
 1118 your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel  
 1119 results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a  
 1120 look at the examples here: [example Highlights](#).

1121 Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use  
 1122 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including  
 1123 spaces, per bullet point).

#### 1124 Abstract

1125 A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research,  
 1126 the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the  
 1127 article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if  
 1128 essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, nonstandard or  
 1129 uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their  
 1130 first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than  
 1131 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

#### 1132 Keywords

1133 Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and  
 1134 avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing  
 1135 with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords  
 1136 will be used for indexing purposes.

#### 1137 Acknowledgements

1138 Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references;  
 1139 therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who  
 1140 provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading  
 1141 the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

#### 1142 Formatting of funding sources

1143 List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

1144 Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy];  
 1145 the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States  
 1146 Institutes of Peace [grant number aaaa].

1147 It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When  
 1148 funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research  
 1149 institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

1150 If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

1151 This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or  
 1152 not-for-profit sectors.

#### 1153 Nomenclature and units

- 1154 Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If  
1155 other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical](#)  
1156 [Nomenclature and Related Documents](#) for further information.
- 1157 Math formulae
- 1158 Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with  
1159 normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional  
1160 terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more  
1161 conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed  
1162 separately from the text (if referred to explicitly in the text).
- 1163 Footnotes
- 1164 Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word  
1165 processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate  
1166 the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the  
1167 article. Do not include footnotes in the Reference list.
- 1168 Artwork
- 1169 Image manipulation
- 1170 Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for  
1171 purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with  
1172 accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature  
1173 within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of  
1174 brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate  
1175 any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must  
1176 be disclosed in the figure legend.
- 1177 Electronic artwork General points
- 1178 Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- 1179 Embed the used fonts if the application provides that option.
- 1180 Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use  
1181 fonts that look similar.
- 1182 Number the illustrations according to their sequence in the text.
- 1183 Use a logical naming convention for your artwork files.
- 1184 Provide captions to illustrations separately.
- 1185 Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- 1186 Submit each illustration as a separate file.
- 1187 Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.
- 1188 A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.



1189 **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

1190 *Formats*

1191 If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then  
1192 please supply 'as is' in the native document format.

1193 Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is  
1194 finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution  
1195 requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

1196 EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

1197 TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

1198 TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000  
1199 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum  
1200 of 500 dpi.

1201 Please do not:

1202 Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low  
1203 number of pixels and limited set of colors;

1204 Supply files that are too low in resolution;

1205 Submit graphics that are disproportionately large for the content.

1206 Color artwork

1207 Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS  
1208 Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable  
1209 color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color  
1210 online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are  
1211 reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive  
1212 information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate  
1213 your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic  
1214 artwork.](#)

1215 Figure captions

1216 Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A  
1217 caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep  
1218 text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

1219 Text graphics

1220 Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX  
1221 and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

1222 Tables

1223 Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant  
1224 text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with

- 1225 their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of  
 1226 tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the  
 1227 article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.
- 1228 References
- 1229 Citation in text
- 1230 Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa).  
 1231 Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal  
 1232 communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these  
 1233 references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the  
 1234 journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or  
 1235 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted  
 1236 for publication.
- 1237 Web references
- 1238 As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any  
 1239 further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.),  
 1240 should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a  
 1241 different heading if desired, or can be included in the reference list.
- 1242 Data references
- 1243 This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them  
 1244 in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the  
 1245 following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and  
 1246 global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify  
 1247 it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.
- 1248 References in a special issue
- 1249 Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the  
 1250 text) to other articles in the same Special Issue.
- 1251 Reference management software
- 1252 Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference  
 1253 management software products. These include all products that support [Citation Style Language](#)  
 1254 [styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the  
 1255 appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will  
 1256 be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please  
 1257 follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference  
 1258 management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic  
 1259 manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management](#)  
 1260 [software](#).
- 1261 Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the  
 1262 following link:
- 1263 <http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

- 1264 When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins  
1265 for Microsoft Word or LibreOffice.
- 1266 Reference style
- 1267 *Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can  
1268 be referred to, but the reference number(s) must always be given.
- 1269 *List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear  
1270 in the text.
- 1271 *Examples:*
- 1272 Reference to a journal publication:
- 1273 Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci*  
1274 *Commun*2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.
- 1275 Reference to a journal publication with an article number:
- 1276 Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article.  
1277 *Heliyon*.2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205> Reference to a book:
- 1278 Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.
- 1279 Reference to a chapter in an edited book:
- 1280 Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, SmithRZ,  
1281 editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.
- 1282 Reference to a website:
- 1283 Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK,  
1284 <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March  
1285 2003].
- 1286 Reference to a dataset:
- 1287 [dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease  
1288 and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. [https://doi.org/10.17632/](https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1)  
1289 [xwj98nb39r.1](https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1).
- 1290 Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6  
1291 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for  
1292 Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also  
1293 [Samples of Formatted References](#)).
- 1294 Journal Abbreviation Source
- 1295 Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations:  
1296 <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations:  
1297 <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service):  
1298 <http://www.cas.org/sent.html>

1299 Video

1300 Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific  
1301 research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are  
1302 strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the  
1303 same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text  
1304 where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to  
1305 the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable,  
1306 please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150  
1307 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the  
1308 electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply  
1309 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate  
1310 image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data.  
1311 For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and  
1312 animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the  
1313 electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

1314 Supplementary material

1315 Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your  
1316 article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel  
1317 or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article  
1318 and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to  
1319 supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file.  
1320 Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in  
1321 Microsoft Office files as these will appear in the published version.

1322 Research data

1323 This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where  
1324 appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to  
1325 the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate  
1326 reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models,  
1327 algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

1328 Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement  
1329 about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of  
1330 these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to  
1331 the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing,  
1332 sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

1333 Data linking

1334 If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to  
1335 the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with  
1336 relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding  
1337 of the research described.

1338 There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link  
1339 your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more  
1340 information, visit the [database linking page](#).

1341 For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published  
1342 article on ScienceDirect.

1343 In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your  
1344 manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053;  
1345 PDB: 1XFN).

1346 Mendeley Data

1347 This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and  
1348 processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your  
1349 manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading  
1350 your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley*  
1351 *Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article  
1352 online.

1353 For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

1354 Data in Brief

1355 You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a  
1356 data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data  
1357 are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all  
1358 upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*).  
1359 You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly  
1360 alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article  
1361 will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published  
1362 open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is  
1363 payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please  
1364 use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

1365 Data statement

1366 To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission.  
1367 This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or  
1368 unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for  
1369 example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your  
1370 published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

1371 Additional Style Notes

1372 Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

1373 Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the  
1374 genericname, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with  
1375 cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").

1376 Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant'  
1377 (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.

1378 Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used  
1379 in a strict statistical context.

- 1380 Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of  
1381 measure, e.g. five embryos, 5 min
- 1382 Use the following expressions
- 1383 transrectal palpation, not rectal palpation
- 1384 nucleus transfer, not nuclear transplant
- 1385 estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- 1386 sperm can be used as both noun and adjective
- 1387 120 to 125, not 120-125
- 1388 treatment by period, not treatment X period
- 1389 gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- 1390 magnification: X 100
- 1391 identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 1392 3 d, Day 3 (define Day 0)
- 1393 Standard definitions
- 1394 oogonium: female gamete before meiosis
- 1395 oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the  
1396 first polar body
- 1397 oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body•
- 1398 ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female  
1399 pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- 1400 germinal vesicle: nucleus of the ovum
- 1401 zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage•
- 1402 embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are  
1403 largely complete
- 1404 fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- 1405 conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- 1406 abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- 1407 premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- 1408 stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)
- 1409 Abbreviations

- 1410 Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else,  
 1411 including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may  
 1412 not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must  
 1413 be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to  
 1414 conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and  
 1415 acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use  
 1416 "section" or "hysterotomy."
- 1417 The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations  
 1418 exclude periods):
- 1419 *theriochart.jpgchart Units of Measure* cpm - counts per min dpm - disintegrations per min g - gram  
 1420 ga - gauge of hypodermic needle h - hour kg - kilogram
- 1421 L - liter mL - milliliter  $\mu$ L - microliter m - meter min - minute mo - month s - second v:v - volume  
 1422 ratio wk - week
- 1423 wt/vol - weight per volume y - year
- 1424 *Routes of treatment* id - intradermal im - intramuscular iu - intrauterine iv - intravenous sc -  
 1425 subcutaneous po - oral
- 1426 Statistical expressions
- 1427 ANOVA - analysis of variance CV - coefficient of variation df - degrees of freedom
- 1428 F - variance ratio
- 1429 NS - not significant
- 1430 P - probability
- 1431 SD - standard deviation
- 1432 SEM - standard error of the mean r - correlation coefficient
- 1433 2
- 1434 r - coefficient of regression ***Additional information***
- 1435 For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: TheCBE*  
 1436 *Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition.*
- 1437 For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult theCBE  
 1438 *Manual* or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- 1439 For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence.  
 1440 Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your  
 1441 manuscript.
- 1442 AFTER ACCEPTANCE
- 1443 Online proof correction

1444 To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof  
1445 corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online  
1446 proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to  
1447 MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions  
1448 from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing  
1449 you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

1450 If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All  
1451 instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods  
1452 to the online version and PDF.

1453 We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this  
1454 proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and  
1455 figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this  
1456 stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us  
1457 in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent  
1458 corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

1459 Offprints

1460 The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free  
1461 access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for  
1462 sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra  
1463 charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is  
1464 accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via  
1465 Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access  
1466 do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on  
1467 ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

1468 AUTHOR INQUIRIES

1469 Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from  
1470 Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

1471 You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be](#)  
1472 [published](#).

1473 © Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

1474

1475