

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO HORMONAL, IMUNOISTOQUÍMICA E DA EXPRESSÃO GÊNICA
DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO E PRÓGESTERONA EM CADELAS (*Canis
familiaris*) NAS DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL E COM PIOMETRA

PRISCILA CARVALHO DE OLIVEIRA

BOTUCATU – SP
JANEIRO – 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO HORMONAL, IMUNOISTOQUÍMICA E DA EXPRESSÃO GÊNICA
DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM CADELAS (*Canis
familiaris*) NAS DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL E COM PIOMETRA

PRISCILA CARVALHO DE OLIVEIRA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, junto ao programa de pós-graduação para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de concentração Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Denise Lopes

BOTUCATU – SP
JANEIRO – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Oliveira, Priscila Carvalho de.

Avaliação hormonal, imunoistoquímica e da expressão gênica de receptores de estrógeno e progesterona em cadelas (*Canis familiaris*) nas diferentes fases do ciclo estral e com piometra / Priscila Carvalho de Oliveira. – Botucatu : [s.n.], 2008

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientador: Prof^a. Dr^a Maria Denise Lopes

Assunto CAPES: 50504002

1. Cão - Reprodução. 2. Reprodução animal.

CDD 636.70824

Palavras-chave: Cadelas; HCE; Piometra; Receptores hormonais.

Nome do Autor: Priscila Carvalho de Oliveira

Título: AVALIAÇÃO HORMONAL, IMUNOISTOQUÍMICA E DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES DE ESTROGENO E PROGESTERONA EM CADELAS (*CANIS FAMILIARIS*) NAS DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL E COM PIOMETRA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^{fa}. Dr^a. Maria Denise Lopes
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^{fa}. Dr^a. Renée Laufer Amorim
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^{fa}. Dr^a. Clair Motos de Oliveira
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – São Paulo

Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo
Membro
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal
FCAV - UNESP – Jaboticabal

29 de janeiro de 2008.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Julio César de Carvalho Balieiro pela paciência, compreensão, amor e amizade.

Ao meu filho Arthur que nasceu durante o curso de doutorado e me mostrou um outro sentido para vida.

Aos meus pais, Maria Lucia e José Eduardo, que sempre me incentivaram e que são um exemplo de vida. Minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos Luciana, Cristina e Joaquim.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista-Campus Botucatu (FMVZ-UNESP, Botucatu), em particular aos professores dos Departamentos de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, que participaram do Programa de Doutorado, pelos ensinamentos.

À Profa. Dra. Maria Denise Lopes pela eficiente orientação, paciência, amizade, incentivo pela compreensão e ensinamentos transmitidos.

À Profa. Dra. Eunice Oba pelo uso do laboratório de endocrinologia.

Ao Prof. Dr. José Buratini Jr., Dra. Paula Ripamonte Figueiredo, Anthony Castilho, pelo auxílio na realização das análises de expressão gênica.

Ao Departamento de Patologia Veterinária da UNIFEOP, Prof. Helder Esteves Thomé e em especial a Profa Dra. Veridiana Moura (UFG, Goiânia) pelo auxílio na realização das análises de imunistoquímica.

Aos professores Dra. Maria Denise Lopes (FMVZ/Botucatu), Dr. Nereu Carlos Prestes (FMVZ/Botucatu), Dra. Renée Laufer Amorim (FMVZ/Botucatu), Dra. Clair Motos de Oliveira (FMVZ/USP), Dr. Gilson Hélio Toniollo (FCAV-Jaboticabal) pelas preciosas críticas e sugestões.

Ao Prof. Dr. Julio César de Carvalho Balieiro FZEA/USP-Pirassununga pelas análises estatísticas.

À UNIFEOP pela liberação de minhas atividades para que pudesse concluir este doutorado.

Aos colegas de pós-graduação Viviane, Fabiana, Jorge, Ana Isabel e em especial ao Iam pelo auxílio na realização das dosagens hormonais séricas.

Ao Cristiano de Carvalho Balieiro pelos momentos de descontração e tensão passados juntos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para realização deste estudo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no PCR em tempo real para amplificação dos genes ER α , ER β , PR e RPS5	24
Tabela 2 - Anticorpos e suas características de marcação celular utilizados na padronização da técnica de imunistoquímica	27
Tabela 3 - Diluição, recuperação antigênica e soluções tampão utilizadas na padronização da técnica de imunistoquímica	27
Tabela 4 - Estimativas de médias e erros padrão para as dosagens de progesterona nas diferentes fases do ciclo estral, dentro de cada grupo comparativo avaliado	32
Tabela 5 - Número de observações (N), estimativas de médias (MED), erros padrão (EP), valores de mínimos (MIN) e máximos (MAX) para os receptores de estrógeno ER- α e ER- β , bem como, para o receptor de progesterona PR avaliados	38
Tabela 6 - Distribuição das freqüências observadas para as análises dos receptores de estrógeno alfa e beta, bem como, para o receptor de progesterona (ER- α , ER- β e PR) avaliados por meio de PCR em tempo real, segundo o grupo comparativo e as fases do ciclo estral	39
Tabela 7 - Estimativas de médias e erros padrão para receptores hormonais ER- α , ER- β e PR, segundo as diferentes fases do ciclo estral, dentro de cada grupo comparativo avaliado.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 8 - Número de observações (N), estimativas de médias (MED), erros padrão (EP), valores mínimos (MIN) e máximos (MAX) para porcentagens de células imunopositivas para o receptor hormonal de estrógenos em escala original (PCPOSIT), após a transformação de escala (ASPCPOSIT) e os números médios de células contados (TOTCELS) por campo avaliado na microscopia .	46
Tabela 9 - Estimativas de médias e erros padrão das porcentagens de células imunopositivas para o receptor de estrógeno, dentro das diferentes fases e tecidos, segundo os grupos comparativos avaliados	47
Tabela 10 - Estimativas dos coeficientes de correlação momento-produto de <i>Pearson</i> entre as dosagens hormonal de progesterona sérica, da expressão gênica dos receptores hormonais ER- α , ER- β e PR, bem como, as quantificações nos diferentes tecidos obtidos pela técnica de imunistoquímica, no animais do grupo controle (animais normais)	51
Tabela 11 - Estimativas dos coeficientes de correlação momento-produto de <i>Pearson</i> entre a dosagem hormonal de progesterona sérica, da expressão gênica dos receptores hormonais ER- α , ER- β e PR, bem como, as quantificações nos diferentes tecidos obtidos pela técnica de imunistoquímica, no animais do grupo experimental (animais com piometra)	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativas de médias e erros padrão para os níveis de progesterona (ng/ml), de acordo com a fase do ciclo estral e dentro de cada grupo comparativo	33
Figura 2 - Frequências de ocorrências de fases do ciclo estral nos animais controle, segundo os métodos de classificação	34
Figura 3 - Frequências de ocorrências de fases do ciclo estral nos animais do grupo experimental, segundo os métodos de classificação (citologia vaginal e concentração de progesterona).....	34
Figura 4 - Histologia das fases de anestro e pro estro em cadelas do grupo controle.....	35
Figura 5 - Histologia das fases de estro e diestro em cadelas do grupo controle.....	36
Figura 6 - Histologia das fases de anestro e diestro em cadelas do grupo experimental.....	37
Figura 7 - Estimativas de médias e erros padrão para as expressões gênicas de ER- α , de acordo com a fase do ciclo estral e dentro de cada grupo comparativo	41
Figura 8 - Estimativas de médias e erros padrão para as expressões gênicas de ER- β , de acordo com a fase do ciclo estral e dentro de cada grupo comparativo	41
Figura 9 - Estimativas de médias e erros padrão para as expressões gênicas de PR de acordo com a fase do ciclo estral e dentro de cada grupo comparativo	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 10 -	Imunomarcção de endométrio de cadelas na fase de anestro nos grupos controle e experimental.....	44
Figura 11 -	Imunomarcção de endométrio de cadelas na fase de diestro nos grupos controle e experimental.....	45
Figura 12 -	Porcentagens de células imunopositivas para o receptor de estrógeno, dentro das diferentes fases do ciclo estral e tecidos, bem como, em cada grupo avaliado	48

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Etiopatogenia	3
2.1.1. Hormônios exógenos	4
2.1.2. Aspectos microbiológicos	5
2.2. Sinais Clínicos	5
2.3. Exames complementares	6
2.3.1. Exames radiográficos	6
2.3.2. Exames ultra-sonográficos	6
2.3.3. Exames hematológicos	7
2.3.4. Exames bioquímicos	7
2.4. Diagnóstico	8
2.5. Tratamentos	9
2.5.1. Tratamento cirúrgico	9
2.5.2. Terapia médica.....	10
2.6. Prognóstico	12
2.7. Avaliação de receptores hormonais	13
2.7.1. Avaliação molecular de receptores hormonais	13
2.7.2. Avaliação imunoistoquímica de receptores hormonais	16
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Animais	21
4.2. Dosagem sérica de progesterona e estrógeno	21
4.3. Citologia Vaginal	21
4.4. Exame histológico	22

SUMÁRIO

	Página
4.5 Avaliação da expressão gênica dos receptores de hormônios sexuais por meio de PCR em tempo real.....	22
4.5.1 Extração do RNA e reação de transcrição reversa	22
4.5.2 Caracterização do perfil de expressão gênica por PCR em tempo real	23
4.5.3 Determinação da expressão gênica relativa	24
4.6. Exame de imunistoquímica para receptores de estrógeno e progesterona	25
4.6.1 Padronização da técnica de imunistoquímica.....	25
4.7. Análises estatísticas	28
5. RESULTADOS	31
5.1 Avaliação das dosagens hormonais de progesterona e estradiol séricos	31
5.2 Avaliação da citologia vaginal e histopatologia uterina.....	32
5.3 Avaliação da expressão gênica dos receptores hormonais	38
5.4 Avaliação imunistoquímica dos receptores hormonais	43
5.4.1 Padronizações das técnicas de imunistoquímica	43
5.4.2 Avaliação quantitativa das marcações obtidas pela técnica de imunistoquímica	43
5.5 Estimativas de correlações entre as avaliações hormonal de progesterona, da expressão gênica dos receptores hormonais e das quantificações obtidas pela técnica de imunistoquímica	49
5.6 Resumo dos resultados	53

SUMÁRIO

	Página
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	65
8. BIBLIOGRAFIA	66

RESUMO

Avaliação hormonal, imunoistoquímica e da expressão gênica de receptores de estrógeno e progesterona em cadelas (*Canis familiaris*) nas diferentes fases do ciclo estral e com piometra

Os objetivos do presente estudo foram avaliar as concentrações hormonais séricas de progesterona e estradiol, a expressão gênica de receptores de estrógeno (ER- α e ER- β) e progesterona (PR), bem como, expressão de receptores de estrógeno e progesterona por meio de técnicas de imunoistoquímica, em cadelas normais (grupo controle) e com piometra (grupo experimental) em diferentes fases do ciclo estral. Foram utilizadas 51 fêmeas caninas submetidas à ovariectomia sendo 30 animais de conveniência e 21 com diagnóstico de piometra. Os níveis de progesterona para os 51 animais variaram entre 0,11 e 38,00 ng/ml, com média e erro padrão de $7,46 \pm 1,52$ ng/ml, respectivamente. Foi observado que os animais do grupo controle apresentaram concentrações séricas de progesterona significativamente superiores ($P < 0,01$) em relação aos animais do grupo experimental, particularmente na fase de diestro. Não foram detectadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as freqüências de ocorrências nas classificações citológicas e com base nos níveis de progesterona, para animais normais e com piometra. Nos animais clinicamente saudáveis, foram observados em 6,6% com Hiperplasia Endometrial Cística (HEC) e 93,4% sem HEC. Para os animais com piometra, 100% exibiram HEC. Não foram verificadas diferenças significativas ($P > 0,05$) nas expressões gênicas de receptores ER- α e PR entre os grupos avaliados nas diferentes fases do ciclo estral. Entretanto, as expressões gênicas de receptor ER- β apresentaram diferenças significativas ($P < 0,01$), com os animais do grupo controle exibindo maiores taxas de transcrição quando comparados aos animais do grupo experimental, na fase de diestro. As porcentagens de células imunopositivas para o receptor de estrógeno, obtidos pela técnica de imunoistoquímica, bem como, os escores de intensidade de marcação, foram significativamente ($P < 0,01$) superiores nos animais do grupo experimental quando comparados aos animais controle, para

as fases de anestro e diestro, e para todas as camadas do tecido uterino avaliados. A correlação obtida entre a concentração de progesterona sérica (P4) e a expressão gênica do receptor de estrógeno beta (ER- β), assumiu um valor de 0,7114, no grupo controle. A etiologia exata da HCE ainda não é totalmente conhecida nas cadelas e os hormônios esteróides e seus receptores apresentaram uma importante relação com as alterações histológicas visíveis no endométrio, durante o ciclo estral. Embora modificações nos receptores de estrógenos e progesterona tenham sido descritos no endométrio de cadelas com HCE, provavelmente não são os únicos fatores envolvidos. Outros estudos são necessários em cadelas normais e com piometra visando o melhor entendimento da etiologia de piometra, bem como, as relações entre esses e outros fatores e a expressão de receptores de ER e PR.

Palavras-chave: Hiperplasia endometrial cística; receptores hormonais; cadelas; piometra.

ABSTRACT

Hormonal evaluation, immunohistochemical analysis and estrogen and progesterone receptors gene expression in Bitch (*Canis familiaris*) at different stages of the estrous cycle and pyometra

The aim of present study were evaluate estradiol and progesterone serum hormonal levels, estrogen (ER- α e ER- β) and progesterone (PR) receptors gene expression, as well as estrogen and progesterone receptors expression by immunohistochemical techniques in health bitches (control group) and piometra (experimental group) at different stages of the estrous cycle. Fifty one bitches were submitted to ovariohysterectomy, which thirty normal dogs and twenty one with pyometra. The progesterone levels for all animals varied between 0.11 e 38.00 ng/ml, with mean and standard error of 7.46 ± 1.52 ng/ml, respectively. Control group animals had significantly higher progesterone serum hormonal levels than experimental groups ($P < 0.01$), specially at diestrus stage. Significant differences were not detected ($P > 0.05$) for occurred frequencies between cytological classifications and progesterone levels classifications to the different groups. To healthy animals were observed only 6.6% with cystic endometrial hyperplasia (HEC) and 93.4% without HEC. To experimental group, 100% showed HEC. Significant differences were not observed ($P > 0.05$) for ER- α and PR receptors gene expressions among evaluated groups at different stages of the estrous cycle. However, ER- β receptor gene expression had significant difference ($P < 0.01$), with control group animals exhibiting higher rate of transcription than experimental group in diestrus stage. The percentages of immunopositive cells for estrogen receptor and stained intensity scores were significantly higher ($P < 0.01$) to experimental group animals when compared with control group animals for anestrus and diestrus stages and for all uterine tissue layers evaluated. The correlation obtained among progesterone serum hormonal levels (P4) and the estrogen (ER- β) receptors gene expression had a value of 0.7114 on control group. The HCE right etiology is not totally known in bitches and the steroids hormones and it's receptors presented an important

association with visible endometrium histological alterations during estral stage. In despite of estrogen and progesterone receptors modifications have been described on bitches uterine with HCE, probably it is not the unique involved factors. Further studies need to be done in normal and with piometra dogs seeking better pyometra etiology knowledge, as well as the relations between these and others factors and the ER and PR receptors expression.

Keywords: Cystic endometrial hyperplasia; hormonal receptors; bitch, pyometra.

1. INTRODUÇÃO

O complexo hiperplasia cística endometrial (HEC) – piometra é uma síndrome aguda ou crônica, que ocorre após o estro e afeta principalmente cadelas adultas e nulíparas (JOHNSTON et al., 2001). A patogenia da piometra não é completamente conhecida, apesar de décadas de estudo direcionados a etiologia da doença.

A teoria clássica considera que a hiperplasia cística endometrial – piometra é como uma consequência de estímulos hormonais crônicos que resultam em um quadro de hiperplasia endometrial, aumentando a susceptibilidade do endométrio à infecção bacteriana secundária. (FELDMAN e NELSON, 2004). Entretanto, a teoria mais recente sugere que uma infecção uterina subclínica pode ocorrer primariamente, promovendo estímulos para a hiperplasia e hipertrofia do endométrio. A associação da hipertrofia com um aumento da secreção glandular poderia exacerbar a infecção primária levando a um aumento da secreção pelas glândulas endometriais e células do epitélio luminal progredindo para piometra (VERSTEGEN e VERSTEGEN-ONCLIN, 2006).

A piometra é fisiopatologicamente distinta de outras infecções uterinas, como a metrite pós-parto, que ocorrem em outros estágios do ciclo reprodutivo. Acredita-se que as bactérias envolvidas na piometra sejam microrganismos oportunistas que ascendem da vagina, visto que, as bactérias mais frequentemente isoladas da piometra canina são pertencentes a microbiota vaginal normal. *Escherichia coli* é isolada na maioria dos casos de piometra canina (JOHNSTON et al., 2001; FELDMAN e NELSON, 2004).

Segundo FERREIRA e LOPES (2000), existem duas síndromes distintas da piometra. A primeira é a síndrome da piometra da cadela idosa, que ocorre em animais com mais de sete ou oito anos de idade, propensos à hiperplasia cística endometrial e subsequente piometra. Essa síndrome é o resultado de exposições sucessivas a progesterona durante as fases de diestro do ciclo estral normal; sendo, portanto, relacionada à idade. A

síndrome da piometra da cadela jovem está relacionada à administração exógena de estrógenos para prevenir a gestação.

Pelo exposto, observa-se que a etiopatogenia da piometra não é completamente conhecida, apesar de décadas de estudo, fato este que justifica a importância desse trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Etiopatogenia

Feldman e Nelson (2004) relataram que a piometra em cadelas é uma desordem do diestro mediada por hormônio. A hiperplasia endometrial é reconhecidamente causada por uma estimulação crônica da progesterona. A piometra, entretanto, pode ocorrer sem a HCE, mas é extremamente rara.

A piometra se diferencia da metrite por sua ocorrência e desenvolvimento durante o ciclo estral. A metrite pós-parto é uma inflamação do útero causado por infecção bacteriana primária que ocorre normalmente após o parto, quando os níveis de progesterona estão baixos (JOHNSTON et al. 2001; NOAKES et al. 2001).

A concentração plasmática de progesterona em cadelas, em anestro, é baixa (<0,5 ng/mL). A progesterona permanece abaixo de 1,0 ng/mL durante o pro-estro e então começa a se elevar no início do estro, quando, geralmente, atinge concentrações superiores a 2,0 ng/mL. Os níveis de progesterona continuam a aumentar durante o estro e durante as primeiras semanas do diestro, seguindo dessa forma até atingir um platô de concentração sérica e então retorna lentamente para concentrações basais. O retorno para uma concentração inferior a 1,0 ng/mL sinaliza o fim do diestro (FELDMAN E NELSON, 2004). Normalmente durante 9 a 12 semanas após as ovulações, a concentração plasmática de progesterona freqüentemente excede 40 ng/mL. Durante a fase de diestro, a progesterona promove ou fornece suporte ao crescimento endometrial e a secreção glandular, enquanto suprime a atividade do miométrio, permitindo o acúmulo de secreções glandulares uterinas. Essas secreções promovem um excelente meio para o desenvolvimento bacteriano. O crescimento bacteriano é também favorecido pela inibição da resposta leucocitária à infecção. Dessa maneira o útero se torna o principal alvo da colonização bacteriana.

As infecções bacterianas associadas a piometra envolvem as mesmas bactérias da flora vaginal normal. Essas bactérias freqüentemente ultrapassam a cérvix e são encontradas no útero durante o pro-estro e estro (FELDMAN e NELSON, 2004).

Noakes et al. (2001) e Fransson e Ragle (2003) consideraram que hormônios endógenos como a progesterona estimulam a secreção das glândulas endometriais e suprimem as contrações uterinas, causando um acúmulo de fluido no interior das glândulas endometriais e lúmen uterino criando um ambiente intra-uterino predisposto ao crescimento bacteriano. Entretanto, para que a piometra se desenvolva é necessário que o endométrio esteja sensibilizado pela ação do estrógeno (DE BOSSCHERE et al., 2001).

Chen et al. (2006) trabalharam com 14 cadelas submetidas à ovariectomia entre 2 e 4 anos de idade, sem histórico de uso de estrógeno ou progesterona. O objetivo do estudo foi induzir HEC por meio de sutura com fio de seda em apenas um corno uterino, sendo o outro, considerado controle e as fêmeas receberam tratamento com benzoato de estradiol e acetato de megestrol. O estudo demonstrou que: (i) a HEC foi reversível depois da retirada da progesterona; (ii) a progesterona mantém a HEC na presença ou ausência do agente irritante; e (iii) a persistência da irritação endometrial na ausência de progesterona pode não manter a HEC.

2.1.1 Hormônios Exógenos

Noakes et al., (2001) relataram que as expressões dos receptores de estrógeno e progesterona são modificadas por hormônios esteróides exógenos, mas não há evidência que comprovem que mudanças nesses receptores estão envolvidas na etiopatogenia da piometra.

A hipótese de que o uso de hormônios exógenos cause o complexo HEC/piometra já foi relatada há muitos anos. A administração de progesterona e estrógeno juntos ou em seqüência, causando a doença em cadelas intactas ou submetidas a ovariectomia já foi constatado, entretanto, o uso do estrógeno isoladamente não foi eficiente para produzir a doença. A administração de progesterona em cadelas com idade acima de cinco anos foi suficiente para causar a piometra (NOAKES, et al. 2001). Segundo Nelson e Kelly (1976) a severidade da doença causada por administração de esteróides exógenos é dose dependente.

Arora et al. (2006) objetivando desenvolver um modelo para o estudo da HEC/piometra, trabalharam com 15 cadelas submetidas à ovariectomia e tratadas com benzoato de estradiol e acetato de megestrol associados à

inoculação intravaginal e intra-uterina de *E.coli*. Esses autores induziram a HEC/piometra em 100% dos animais, mas não obtiveram resultado positivo quando inocularam a bactéria por via intravaginal.

2.1.2 Aspectos microbiológicos

As bactérias frequentemente isoladas dos cultivos uterinos em casos de piometra são microrganismos oportunistas que ascendem da vagina (SANDHOLM et al., 1975; WADAS et al., 1996; ETTINGER, 1997; JOHNSTON, et al., 2001; FRANSSON e RAGLE 2003). *Escherichia coli* é a bactéria isolada na maioria dos casos de piometra canina. Também ocorrem infecções bacterianas por *Streptococcus hemolítico*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Moraxella* e infecções mistas. Embora a infecção bacteriana não seja a causa primária da piometra canina, é causa da maioria dos casos de morbidade e mortalidade associados à piometra (ETTINGER, 1997; FRANSSON e RAGLE, 2003).

2.2 Sinais clínicos

Os sinais clínicos da piometra não são limitados ao trato reprodutivo e variam de acordo com o relaxamento da cervix. Frequentemente são reportados sinais de anorexia, vômitos, polidipsia, poliúria, letargia e descarga vulvar (FERREIRA e LOPES, 2000; JOHNSTON, et al., 2001; NOAKES, et al. 2001; FRANSSON e RAGLE, 2003). Os sinais clínicos são mais severos em cadelas com piometra fechada e distensão abdominal pelo aumento de volume uterino. Nesse caso a palpação abdominal está contra indicada pelo risco de ruptura uterina (FERREIRA e LOPES, 2000).

Em caso de septicemia ou toxemia podem ocorrer sintomas de choque séptico, com taquicardia, taquipnéia, preenchimento capilar prolongado, pulso femoral fraco e temperatura retal reduzida (FERREIRA e LOPES 2000; FRANSSON e RAGLE, 2003).

2.3 Exames complementares

2.3.1 Exames radiográficos

Segundo Feldman e Nelson (2004), no exame radiográfico de piometra observa-se uma estrutura tubular com grande diâmetro, contendo fluido denso, localizada ventral e caudal ao abdômen, deslocando as alças intestinais crânio-dorsalmente. Radiografias laterais são mais eficientes no diagnóstico de aumento de volume uterino, do que as radiografias ventro-dorsais.

2.3.2 Exames ultra-sonográficos (US)

A ultra-sonografia apresenta diversas vantagens sobre o exame radiográfico, uma vez que, devido à ausência de radiação ionizante, é mais seguro tanto para o paciente como para o clínico. Além disso, a presença de fluido abdominal não interfere tanto na imagem ultra-sonográfica como na radiografia, fornecendo informações não só a respeito da forma e tamanho, mas também da textura dos tecidos e da conformação dos órgãos (ETTINGER, 1997).

O útero dilatado apresenta imagem ultra-sonográfica de uma estrutura tubular bem definida com diâmetro entre 0,5 e 4,0 cm, sendo que essa condição pode variar de acordo com o relaxamento da cérvix. O conteúdo luminal uterino apresenta menor ecogenicidade que a parede, com cintilações ecogênicas bem evidentes (RICHARD e COUTO, 2000; JOHNSTON et al., 2001; NOAKES et al., 2001; FELDMAN e NELSON, 2004).

Bigliardi et al. (2004), realizaram um estudo ultra-sonográfico com 45 cadelas de idade entre 1 e 15 anos, com suspeita clínica de piometra. O útero foi avaliado quanto à integridade do endométrio, presença de exudato e, hiperplasia de glândulas endometriais; esses achados foram correlacionados com o exame histopatológico. Concluíram que a investigação ultra-sonográfica é um método útil e fidedigno para avaliar alterações patológicas de útero e que se constitui em uma ferramenta eficiente para classificar a HEC de graus III e IV, endometrites, piometra hiperplásica e piometra atrófica, segundo classificação de De Bosschere (2001).

2.3.3 Exames hematológicos

Os efeitos sistêmicos da piometra podem ser refletidos nos exames laboratoriais. Por ser uma doença inflamatória crônica, não é surpreendente o encontro de uma discreta anemia normocítica normocrômica não-regenerativa, em função de uma diminuição dos eritrócitos. A septicemia ou toxemia associadas à síndrome podem ser potentes supressores da medula óssea. A hiperproteinemia (7,5 a 10,0 mg/dl) e a hiperglobulinemia encontradas resultam, comumente, da desidratação e/ou estimulação antigênica crônica do sistema imune (ETTINGER, 1997; RICHARD e COUTO, 2000; JOHNSTON, et al., 2001; NOAKES, et al., 2001; FRANSSON e RAGLE 2003 FELDMAN e NELSON, 2004).

De acordo com Ettinger (1997), a contagem de células brancas em cadelas com piometra é variável, geralmente é observada uma neutrofilia absoluta (usualmente 25.000 células/mm³) com graus variáveis de imaturidade celular, secundária à infecção e septicemia. Se a infecção for severa e/ou crônica, pode ocorrer um desvio degenerativo para a esquerda, com presença de neutrófilos tóxicos. Entretanto, alguns resultados demonstraram que nem sempre há leucocitose em casos de piometra e que o diagnóstico definitivo pode não ser correto se depender exclusivamente do achado da leucocitose e da contagem diferencial das células sanguíneas (FALDYMA et al., 2001)

Nas formas fechadas de piometra a leucocitose tende a ser mais grave, devido ao acúmulo de material purulento quimiotático para neutrófilos, elevando dessa forma a contagem de leucócitos totais. Com a abertura da cérvix, existe uma diminuição desses fatores quimiotáticos, podendo inclusive levar a valores normais de leucócitos.

Perez et al. (2002), comparando hemograma de cadelas com piometra de cérvix aberta e fechada relataram que encontraram diferença estatisticamente significativa para as variáveis bastonetes e hemoglobinas, as quais se encontravam aumentadas em cadelas com piometra fechada.

2.3.4 Exames bioquímicos

O aspartato amino-transferase (AST) é uma enzima intracelular liberada de hepatócitos e fibras musculares alterados. A similaridade dos valores de AST em cadelas normais e com piometra sugere que a função hepática

comprometida na piometra raramente inclui dano hepatocelular (ETTINGER, 1997).

Elevados níveis de fosfatase alcalina, bilirrubina e colesterol sérico são considerados como resultados de colestase intra-hepática. A hipercolesterolemia foi positivamente associada à concentração de fosfatase alcalina (FA), que por sua vez foi mais pronunciada em pacientes completamente anoréxicos e especialmente em animais obesos (ETTINGER, 1997).

Dentre as alterações provocadas em outros órgãos pela piometra, a que mais se salienta é a disfunção renal caracterizada pela filtração glomerular reduzida e disfunção tubular (ETTINGER, 1997; FELDMAN e NELSON, 2004; ZARAGOSA et al., 2004). Na fase inicial da doença, a densidade da urina pode ser maior do que 1.030, simplesmente refletindo a desidratação e uma resposta fisiológica à conservação de fluidos. A injúria dos túbulos renais causadas por imunocomplexos é um dos mecanismos propostos para explicar a poliúria/polidipsia.

Provavelmente como resultado dos diabetes *insipidus* secundária renal reversível, a urina torna-se progressivamente mais diluída com densidade entre 1.008 e 1.015 (ETTINGER, 1997; ZARAGOSA et al., 2004).

2.4 Diagnóstico

A suspeita de HCE/piometra é dada pela história clínica e pelos achados físicos (ETTINGER, 1997; FOSSUM, 2001). O aumento de volume uterino pode ser palpável, mas preconiza-se sua comprovação por radiografia ou ultrassonografia (FERREIRA e LOPES, 2000). Devem ser realizados exames complementares como: hemograma completo, perfil bioquímico e urinálise para a detecção de anormalidades metabólicas associadas à septicemia e avaliação da função renal (; RICHARD e COUTO, 2000; FRANSSON e RAGLE, 2003; FELDMAN e NELSON, 2004). A vaginoscopia pode ser recomendada, pois, permite a visualização da mucosa vaginal e a constatação de sinais de inflamação, presença de massas e a determinação da origem da secreção vulvar (FERREIRA e LOPES, 2000).

O diagnóstico diferencial inclui mucometra, hidrometra, vaginites, metrites, torção uterina e peritonite (FOSSUM, 2001) e afecções acompanhadas de síndrome poliúria, polidipsia tais como: diabetes *mellitus*, Síndrome de *Cushing*, nefrite crônica (GILBERT, 1992).

Hagman et al. (2006) mensuraram metabólicos de prostaglandina F2 α para diferenciar a piometra da HEC-mucometra. Verificaram que animais com piometra possuem níveis plasmáticos de metabólicos de prostaglandina muito superiores aos animais com HEC-mucometra. Concluíram, desta forma, que a análise deste metabólico é um valioso método de diagnóstico e predição para severidade da doença.

2.5 Tratamentos

O tratamento cirúrgico é o mais indicado, a menos que o proprietário insista na manutenção da atividade reprodutiva da fêmea (FERREIRA e LOPES, 2000) e deve ser instituído imediatamente, pois a septicemia pode se desenvolver a qualquer momento, se ainda não estiver presente. Por ser um tratamento, na maioria das vezes de emergência, a cirurgia é mais eficiente, segura e a única que permite êxito duradouro.

Cadelas com toxemia grave devem ser tratadas com fluídos politônicos e antibióticos de amplo espectro, antes de serem submetidas a ovário-histerectomia (FANTONI et al., 1999; LOPES e BICUDO, 2002).

2.5.1 Tratamento Cirúrgico

A fluidoterapia intravenosa é indicada na correção dos *déficits* existentes, para manter a perfusão tecidual adequada e para melhorar a função renal (FERREIRA e LOPES, 2000). Deve-se também administrar um antibiótico de amplo espectro eficaz contra *E.coli*, tais como: cefazolina, cefoxitina, amoxicilina mais clavulanato, ampicilina ou trimetropin-sulfonamidas. Os aminoglicosídeos são nefrotóxicos e não são recomendados devido à prevalência de disfunção renal junto com piometra (FOSSUM, 2001).

Após a cirurgia deve-se continuar com terapia de suporte como fluído e antibiótico por sete a 10 dias. No entanto, a maioria dos animais demonstra grande melhora após a remoção do útero, se não houver contaminação abdominal (BIRCHARD, 1998; FOSSUM, 2001; LOPES e BICUDO, 2002). O

controle da função renal e hepática é recomendado, visto que algumas fêmeas podem apresentar insuficiência renal no período pós-operatório em função da sobrecarga renal e hepática logo depois da eliminação dos anestésicos e muitas vezes, o rim já pode estar acometido por uma glomerulonefrite, complicando ainda mais o funcionamento desse órgão (WANKE e GOBELLO, 2006).

2.5.2 Tratamento terapêutico

O tratamento médico para piometra pode ser apropriado em cadelas com alto valor zootécnico, que apresentem condições sistêmicas. (NOAKES et al., 2001).

A terapia da piometra se baseia no uso de agentes farmacológicos para reduzir a concentração plasmática de progesterona, relaxar a cervix e promover contração miometrial, resultando em drenagem do conteúdo uterino. O agente farmacológico mais usado e de resposta mais consistente é a prostaglandina. Juntamente ao tratamento com prostaglandina devem ser administrados antibióticos bactericidas de grande espectro, sistêmico que podem ser determinados por cultivo e sensibilidade (JOHNSTON, et al., 2001; NOAKES, et al. 2001; FOSSUM, 2001; FRANSSON e RAGLE, 2003).

A prostaglandina F2 α (PGF 2 α) age proporcionando dilatação cervical, contração miometrial e em doses altas, luteólise. Os efeitos colaterais da terapia com prostaglandina são observados rotineiramente, especialmente nas administrações iniciais. Eles incluem inquietação, respiração ofegante, vômito, defecação, taquicardia, febre, dor abdominal e salivação. Podem-se reduzir empiricamente os efeitos colaterais, através de uma caminhada com animal 30 minutos após cada injeção (BIRCHARD, 1998).

Hafez (2002) relatou que o protocolo usado em cadelas é de 0,1 - 0,25 mg/kg de PGF2 α subcutâneo, uma vez ao dia, por três a cinco dias. A duração da terapia é ditada pela resposta, à medida que ocorre a redução do tamanho uterino. O tipo de corrimento vaginal geralmente mudará para seroso ou sero sanguinolento antes de desaparecer completamente.

Fransson e Ragle (2003) relataram a administração de PGF2 α , intra-vaginal, usando cateter plástico estéril, na dose de 0,15 mg/kg e obtiveram sucesso em 13 de 15 cadelas tratadas. Em casos de cadelas refratárias a

PGF2 α ou com cervix fechada, a drenagem foi realizada usando cateter plástico no lúmen do útero colocado através da vagina, neste experimento, nove de 12 cadelas apresentaram bons resultados.

Outros protocolos são descritos para o tratamento de piometra. A utilização de anti-progestágenos como o RU46534 e aglepristone causam aumento da contratilidade miometrial e relaxamento cervical, auxiliando no tratamento (JOHNSTON et al., 2001; NOAKES et al., 2001).

Inibidores da prolactina (cabergolina) na dose de 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ associado ao cloprostenol 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a cada dois dias durante 10 dias foi descrito com sucesso (NOAKES et al., 2001).

Corrada et al. (2006), relataram o tratamento de 29 cadelas com diagnóstico de HEC, utilizando diariamente cabergolina na dose de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ VO, associado ao cloprostenol 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ SC de 7 a 14 dias. Junto com esse tratamento os animais receberam antibióticos e fluidoterapia. Vinte e quatro animais estavam curados entre os dias sete e 14 de tratamento. O diâmetro uterino começou a diminuir três dias após o início do tratamento e continuou gradativamente até voltar ao tamanho normal por volta do dia 14. Houve recidiva em seis dos 29 animais.

England et al. (2007) trataram 22 cadelas com diagnóstico de piometra utilizando a combinação de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de cabergolina ao dia, com 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de cloprostenol a cada três dias e sulfonamida, duas vezes ao dia. O perfil hematológico de 21 cadelas voltou ao normal com seis dias de tratamento, já o perfil bioquímico em 9 dias; 19 cadelas estavam controladas com 10 dias de tratamento, duas precisaram de mais três dias e uma cadela com torção parcial de útero foi realizada cirurgia. Onze de vinte e um animais tratados com sucesso foram acasalados no estro seguinte, sendo que sete, ficaram prenhes. Quatro cadelas tratadas apresentaram recorrência de piometra, após o cio seguinte.

Trasch et al. (2003) utilizaram aglepristone como tratamento terapêutico de piometra. Relataram que 92,8% das cadelas estavam curadas após três semanas do início do tratamento. Uma fêmea morreu de insuficiência renal e três não apresentaram corrimento vaginal, assim, a OSH foi recomendada; os autores concluíram que esse tratamento apresenta uma alta taxa de cura.

Fieni (2006) avaliou a eficácia do aglepristone (10 mg/kg nos dias 1, 2 e, 8) para o tratamento de metrite ou piometra em cadelas, com ou sem adição de baixas doses de cloprostenol (1µg/kg) por cinco dias (dias 3 a 7). Exames foram realizados nos dias 8, 14 e 28, 90, onde foi determinado que a melhora no tratamento foi mais eficaz entre os dias 14 e 28 em 54 de 67 cadelas. Em cadelas que não estavam curadas, foi repetido o aglepristone nos dias 14 e 28. O aglepristone sozinho curou 15 de 15 cadelas com metrite. Em cadelas com piometra de cervix fechada, houve abertura da mesma, 48 horas após a administração do aglepristone. De 52 cadelas com piometra de cervix aberta ou fechada, com o tratamento adicional de cloprostenol entre os dias 3 a 7, tiveram um aumento significativo na cura, quando comparados com os animais sem cloprostenol ($p < 0,05$). A contagem de leucócitos e a concentração plasmática de progesterona diminuíram ao longo do tratamento. A taxa de recorrência depois de 12 e 24 meses foi de 13% e 19%, respectivamente.

2.6 Prognóstico

O prognóstico da piometra pode variar de reservado a mau, dependendo da fase de evolução da doença, da função renal e da toxicidade sistêmica (FOSSUM, 2001).

Do ponto de vista ginecológico é grave, pois os animais são incapazes de se reproduzirem. Do ponto de vista vital, também é considerado grave, mas certas observações permitem atenuá-las; os elementos que agravam este prognóstico é o estado de desidratação, choque, a insuficiência renal e o tempo da existência da lesão (BIRCHARD, 1998).

O prognóstico para terapia medicamentosa é dependente do relaxamento cervical, se a piometra é aberta, o prognóstico é bom, mas se a piometra é fechada o prognóstico é de reservado a mau. Contudo, uma vez que o animal tenha sido tratado de piometra com prostaglandina, a recidiva é provável (BIRCHARD, 1998). Segundo Smith (2006) os animais tratados deverão ser submetidos a uma cultura vaginal, nos cinco primeiros dias do pro-estro seguinte. Deverão ser tratados com antibióticos e desta forma aumentaremos as chances de gestação. A taxa de sucesso desse procedimento é de 50 a 65%.

2.7 Avaliação de receptores hormonais

O avanço nas técnicas imunistoquímicas e nas áreas de biotecnologia molecular, tem auxiliado os pesquisadores a entenderem as relações de causa-efeito envolvidas na etiopatogenia de diversas doenças. Este fato se deve principalmente a possibilidade de se avaliar, em um dado momento, diferentes eventos específicos relacionados à biologia celular, em um determinado tecido alvo. Estes eventos podem ser avaliados sob os pontos de vista qualitativo e quantitativo, por meio de instrumentos baseados em microscopia óptica, bem como por meio de técnicas moleculares simultaneamente.

2.7.1 Avaliação molecular de receptores hormonais

Toshio et al. (2002) estudaram as relações entre a expressão de mRNA da enzima citocromo P450 aromatase (P450arom) na área mediobasal do hipotálamo, a atividade ovariana da aromatase e a secreção de estrógeno, ao longo do ciclo estral de cadelas da raça Beagle. Usando a reação em cadeia de polimerase (PCR), detectaram o gene transcrito para a P450arom no hipotálamo de cadelas. Os níveis de mRNA da P450arom no hipotálamo aumentaram durante a progressão do anestro e declinaram posteriormente. A atividade ovariana de P450arom foi mensurada e constatada concentração baixa no anestro, com aumento no pro-estro e um declínio posterior. A atividade ovariana de P450arom e os níveis plasmáticos de 17β estradiol se correlacionaram positivamente ($r=0,77$ e $P<0,05$). Esses resultados sugerem que o aumento da expressão gênica da enzima P450arom no hipotálamo está associado com o término do anestro.

Hewitt e Korach (2003) consideraram o estrógeno como um importante modulador das funções reprodutivas normais de mamíferos; desta forma, estudos bioquímicos, fisiológicos e genéticos têm colaborado para o esclarecimento dos mecanismos básicos de ação estrógeno. O estrógeno circulante penetra em células específicas, que contém moléculas de receptores de estrógeno (ER). Na ausência de estrógeno sérico o ER associa-se a uma molécula co-repressora, a qual inibe a atividade de transcrição do ER. A ligação do estrógeno sérico causa uma mudança de conformação na molécula do ER levando a dissociação dos co-repressores e permitindo o recrutamento

dos co-ativadores. Os co-ativadores são moléculas que interagem com o ER e aumentam a taxa de transcrição dos genes que contém ligações fortes com as seqüências de DNA do ER (EREs).

Os ERs são membros de uma família de receptores nucleares (NR) que são moduladores de transcrição. Os NRs modulam a transcrição por interação com seqüências regulatórias de DNA que ligam-se discriminadamente a uma classe particular de NRs, bem como, com moléculas co-ativadoras e co-repressoras, visando regular a atividade do complexo RNA polimerase. Outros exemplos de membros da família NR incluem receptores de hormônios esteróides adicionais como receptores de progesterona e andrógeno, receptores para vitaminas e metabólitos, receptores para vitamina D e ácido retinóico, entre outros (HEWITT e KORACH, 2003).

No caso do ER duas moléculas receptoras têm sido identificadas. O ER α é encontrado em todos os tecidos reprodutivos, é o mais abundante e foi o primeiro ER a ser identificado. O ER β é o produto de um gene diferente e guarda uma pequena similaridade com a molécula do ER α . No entanto, ambos ER α e ER β ligam-se ao estradiol e interagem com as seqüências ERE. Ambos os receptores têm suas atividades transcricionais distintas, com o ER β mostrando uma atividade menos potente que o ER α na maioria do contexto, assim como, na capacidade de inibir a atividade do ER α . A expressão do ER β é mais abundante no ovário, útero, tecido neural, bem como em tecidos reprodutivos de macho em ratos. No ovário de rata o ER α é expresso primariamente nas regiões das células da teca e intersticial, enquanto que o ER β é expresso nas células da granulosa, indicando que embora ambos os ERs estejam presentes no ovário, não estão presentes nas mesmas células (HEWITT e KORACH, 2003).

Tani et al. (1997) visando elucidar mudanças na expressão de mRNA de ER no hipotálamo de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, conduziram dois experimentos com cadelas Beagles normais. No primeiro experimento, foram determinados os níveis de LH plasmáticos, estradiol e progesterona séricos, bem como os níveis de mRNA para ER durante o ciclo estral sendo os animais divididos em seis grupos: início, meio e fim de anestro, pro-estro, estro

e diestro. No segundo experimento o efeito do estradiol sobre a expressão de mRNA de ER foi examinado em animais submetidos a ovariectomia no meio do anestro. Duas semanas após a cirurgia os animais receberam injeções de 0 (controle), 10 ou 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de benzoato de estradiol. Os resultados do primeiro experimento demonstraram que houve um aumento dos níveis de mRNA para ER da fase inicial até o final do anestro. A partir do final do anestro os níveis de mRNA para ER reduziram no pro-estro, e apresentaram as menores concentrações nas fases de estro e diestro. Os níveis de LH no plasma e os níveis de mRNA para ER se correlacionaram positivamente durante as fases de anestro e pro-estro ($r=0,94$). Os níveis de E2 aumentaram significativamente do final do anestro até o final do pro-estro e decresceram significativamente do estro para o diestro ($P<,001$). Os níveis de P4 foram baixos durante o anestro e pro-estro e aumentaram significativamente a partir do pro-estro até o diestro. No experimento dois, os níveis de mRNA para ER no hipotálamo foram relativamente baixos e aumentaram significativamente depois do tratamento com 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de benzoato de estradiol ($P<,001$). Para dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de benzoato de estradiol, entretanto, não foram verificados resultados significativos ($P>,05$) quando comparados ao grupo controle.

Hatoya et al. (2003) mensuraram os níveis de mRNA dos receptores de estrógeno α ($\text{RE}\alpha$) e β ($\text{RE}\beta$) no hipotálamo, na hipófise anterior e nos ovários de cadelas da raça Beagle nas diferentes fases do ciclo estral. Por meio de RT-PCR quantitativo, utilizando a subunidade 18S ribossomal como constitutivo na expressão dos $\text{RE}\alpha$ e $\text{RE}\beta$, detectaram transcritos de $\text{RE}\beta$ em todas as amostras de tecido. Os níveis hipotalâmicos e hipofisários de mRNAs para $\text{RE}\alpha$ e $\text{RE}\beta$ aumentaram na metade do anestro até o pro-estro e declinaram posteriormente. No ovário, os níveis de mRNA do $\text{RE}\alpha$ aumentaram do pro-estro até o diestro e apresentaram uma correlação positiva com os níveis plasmáticos de progesterona ($r=0,62$ e $P<,001$). Os níveis de mRNA do $\text{RE}\beta$ aumentaram da metade do anestro até o pro-estro e tiveram correlação positiva com os níveis de 17 β estradiol plasmático ($r=0,73$ e $P<,001$). Pelos resultados, os autores sugerem que o aumento de mRNAs de $\text{RE}\alpha$ e $\text{RE}\beta$ no hipotálamo e hipófise estão associados com o término do anestro, e que o

aumento de mRNAs para os RE α e RE β nos ovários podem estar envolvidos com o desenvolvimento folicular e a formação do corpo lúteo.

2.7.2 Avaliação imunoistoquímica de receptores hormonais

Estudos têm avaliado a regulação positiva de receptores de hormônios no endométrio que conduzem a uma resposta exagerada para progesterona, estrógeno ou andrógeno, como componente importante no desenvolvimento da piometra (COCK et al., 1997; VERMEIRSCH et al. 1999).

Cock et al. (1997) com a finalidade de comparar a presença de receptores de estrógeno no útero de cadelas normais e com HCE, realizaram imunoistoquímica, utilizando anticorpos monoclonais anti-receptores hormonais humanos. Concluíram que concentrações anormais de receptores de estrógeno foram importantes no desenvolvimento do complexo HCE, mas provavelmente, não são os únicos fatores relacionados à etiologia dessa alteração. Sugeriram ainda, que a avaliação de receptores de outros hormônios, principalmente receptores de progesterona poderia trazer informações valiosas.

Vermeirsch et al. (1999) estudaram a concentração dos receptores de estrógeno durante as fases do ciclo estral nos cornos uterinos, corpo uterino e cervix. Foi observada uma correlação negativa entre as concentrações de receptores medidos em *scores* nos cornos uterinos e os níveis de progesterona sérica. Foi observado também, um *score* maior nos cornos uterinos durante a fase de pro-estro, com diminuição durante o estro e uma concentração mais baixa ainda no início do metaestro. Durante a fase de anestro foram observados *scores* altos para esses receptores, indicando uma sensibilidade estrogênica no estágio de quiescência sexual.

Vermeirsch et al. (2000) trabalhando com imunoistoquímica, detectaram a presença de receptores de estrógeno e progesterona em útero de cadelas prenhes, incluindo a placenta e o útero pós-parto. Relataram uma marcação pequena de receptores de estrógeno nos diferentes tipos celulares de úteros gestantes e no pós-parto. Para o receptor de progesterona a marcação foi ausente ou fraca nas células epiteliais. Entretanto, uma marcação moderada foi encontrada em células do estroma endometrial e miométrio, tipos celulares que desempenham um papel importante na manutenção da gestação. As células

estromais são freqüentemente mais marcadas para os receptores de estrógeno e progesterona do que as células epiteliais, indicando que ambos os hormônios podem agir indiretamente nas células epiteliais, via células estromais. Os autores não observaram diferença na distribuição de receptores de progesterona no tecido uterino entre gestação e o pós-parto, sugerindo que durante o parto existe um decréscimo nos níveis de progesterona sérica e concomitantemente um incremento na taxa de estrógeno/progesterona. Essas alterações são provavelmente mais importantes do que o declínio nos receptores avaliados.

Na placenta, as células fetais não mostraram evidência de receptores de estrógeno ou progesterona. Em contraste, ambos receptores estavam presentes nas células mesenquimais materna que estão localizadas ao redor da membrana dos vasos sanguíneos. Estas células mostraram sinais de decidualização (Vermeirsch et al. 2000).

De Bosschere et al. (2001) objetivando estudar as alterações histológicas no útero de cadelas, trabalharam com cortes histológicos de útero de 26 cadelas saudáveis e 42 fêmeas com suspeita clínica de piometra. Concluíram que o complexo HCE/piometra pode ser dividido em duas classes: 1) complexo hiperplasia cística endometrial/mucometra e 2) um complexo endometrite/piometra. O complexo endometrite/piometra não necessariamente é seguido do complexo hiperplasia cística endometrial/mucometra, podendo, entretanto surgir conjuntamente.

Vermeirsch et al. (2002) com o objetivo de estudar receptores de andrógeno em útero de cadelas, trabalharam com material de 33 animais saudáveis submetidas a histerectomia. Descreveram a distribuição dos receptores de andrógeno nos cornos uterinos, corpo e cérvix durante os diferentes estágios do ciclo estral. Os autores sugeriram que a expressão basal de receptores de andrógeno no útero de cadelas durante o ciclo estral pode não ser influenciada por hormônios esteróides sexuais.

De Bosschere et al. (2002) trabalharam com a expressão de receptores de estrógeno e progesterona em útero de cadelas com complexo hiperplasia endometrial cística-mucometra (HEC/M) e endometrite/piometra (E/P), em animais que foram tratados com progestágeno. Observaram que no grupo de animais com HEC/M os escores de receptores de estrógeno e progesterona

foram maiores dos que nos animais com útero normal. Já para o receptor de estrógeno no grupo E/P os *escores* foram significativamente menores que em animais com útero normal e HEC/M. Para os receptores de progesterona foi observado no grupo E/P uma tendência maior nos *escores* do que em animais com útero normal. As cadelas tratadas com progestágenos que apresentavam HEC/M ou E/P mostraram *escores* menores de receptores de estrógeno e progesterona, nas diferentes camadas do útero, quando comparadas com animais não tratados.

Dhaliwal et al. (2002) estudaram o efeito da escarificação endometrial sobre receptores de estrógeno e progesterona, mudanças na estrutura histológica e flora uterina. A base do corno uterino de seis cadelas nulíparas, foi escarificada, no início do metaestro, bem como foram realizados *swabs* para cultura. Após 21 dias foi realizada a ovário-histerectomia dos animais. Observaram que em todos os *swabs* não houve crescimento bacteriano e em três das seis cadelas foram relatadas mudanças como distensão do lúmen com secreção e distensão nas glândulas endometriais do segmento escarificado. Não foram encontradas diferenças significativas nos *escores* de receptores de estrógeno e progesterona entre os segmentos escarificados e não escarificados, exceto para o receptor de progesterona no epitélio glandular em que os valores para os segmentos de endométrio escarificados foram significativamente superiores. Concluíram então, que o trauma pode modificar a estrutura do endométrio e as características dos receptores de progesterona.

De Bosschere et al. (2003) induziram piometra em cinco cadelas por meio de inoculação intra-luminal de *Escherichia coli*, na fase de metaestro, em apenas um corno uterino, sendo que o outro corno serviu como controle. Por meio de imunoistoquímica demonstraram que a expressão dos receptores hormonais nos cornos uterinos inoculados correspondeu com a expressão de sintomas de piometra espontânea. Concluíram neste estudo que as mudanças uterinas se devem a uma interação ovário, útero e bactérias que possivelmente são responsáveis pela hiperplasia no corno inoculado e inatividade no corno não inoculado.

Kida et al. (2006) estudaram a expressão da lactoferrina no útero de cadelas com piometra e nas diferentes fases do ciclo estral. Foram encontradas diferentes marcações de lactoferrina nas células do epitélio

luminal e glandular do endométrio nas fases de pro-estro e estro, mas pequenas marcações foram detectadas até o décimo dia de diestro. Nas cadelas com piometra, células do epitélio glandular e estroma uterino foram fortemente marcadas. Quando correlacionados com os níveis de estradiol, os resultados sugeriram que a expressão da lactoferrina e concentrações séricas de estrógeno estão relacionadas: na fase inicial do diestro ocorre uma redução drástica da expressão dessa proteína possivelmente prejudicando o sistema de defesa antimicrobiano.

Bianchi et al. (2006) avaliaram por meio de biópsia uterina, receptores de estrógeno e progesterona no endométrio de lhamas durante a fase folicular (FF) e luteal (FL) do ciclo estral. Demonstraram que os receptores estrogênicos α (RE α) e receptores de progesterona (RP) são maiores durante a fase folicular do que durante a fase luteal, sugerindo que, como em outros ruminantes, o estrógeno regula positivamente ambos os receptores enquanto que a progesterona tem um efeito oposto. Além disso, os resultados suportam a hipótese de que a regulação de receptores esteróides reprodutivos é tipo células-específicas nesta espécie.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo geral contribuir para um melhor entendimento da etiopatogenia do complexo HEC/piometra em cadelas, por meio de determinações das concentrações dos hormônios estrógeno e progesterona plasmáticos, avaliações histopatológicas e imunistoquímica do tecido uterino e pela quantificação da expressão gênica de receptores dos hormônios sexuais, em animais normais e portadores de piometra.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- (i) Avaliação das concentrações de estrógeno e progesterona plasmáticos, nos diferentes fases do ciclo estral, em animais normais e com piometra;
- (ii) Avaliação histopatológica do tecido uterino de animais normais e com piometra;
- (iii) Avaliação por meio de técnica imunistoquímica dos receptores de estrógeno e progesterona em animais normais nos diferentes fases do ciclo estral e com piometra
- (iv) Identificação, quantificação e diferenciação da expressão gênica de receptores de estrógeno e progesterona, no útero de animais normais, nas diferentes fases do ciclo estral e em animais com piometra;
- (v) Avaliação das inter-relações existentes entre os achados moleculares, hormonais e o perfil imunistoquímico dos animais normais, nas diferentes fases do ciclo estral e em animais acometidos pela piometra.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas 51 fêmeas caninas submetidas à ovario-histerectomia (OSH), realizadas no Hospital Veterinário “Vicente Borelli” da UNIFEQB, em São João da Boa Vista-SP. Das 51 fêmeas utilizadas, 30 foram obtidas em campanhas de controle populacional e 21 com diagnóstico clínico de piometra, realizado por meio de exame clínico, radiológico e ultra-sonográfico. Os animais foram divididos em dois grupos: 1) animais normais (grupo controle), constituídos de fêmeas, adultas, em diferentes fases do ciclo estral e 2) animais com piometra (grupo experimental), formado por cadelas com diagnóstico clínico de piometra. As fases do ciclo estral foram determinadas pelo histórico clínico anterior, citologia vaginal e dosagem de progesterona sérica.

4.2 Dosagem sérica de progesterona e estrógeno

Amostras de sangue foram colhidas imediatamente antes da OSH para determinação dos níveis séricos de progesterona e estradiol. Foi utilizado o contador Auto Gamma / Cobra II, *Packard Bioscience Company*, usando a técnica de radioimunoensaio em fase sólida, por meio dos *kits* comerciais de Progesterona e Estradiol COAT-A-COUNT[®], DPC – Med Lab. A detecção limite para progesterona e estradiol foram 0,01233 ng e 0,013 pg, respectivamente. O coeficiente intra-ensaio foi menor que 8,61% para progesterona e 18,5% e estradiol. Os animais de cada grupo (normais e com piometra) foram classificados nas diferentes fases do ciclo estral com base no perfil hormonal da progesterona, conforme Feldman e Nelson (2004).

4.3 Citologia Vaginal

Imediatamente antes da OSH foram colhidas amostras do epitélio vaginal para citologia. A citologia vaginal foi realizada com um *swab* previamente umidificado com solução fisiológica e, posteriormente introduzido pela comissura dorsal da vulva, em um ângulo de 45°. O *swab* foi introduzido o mais profundamente possível e rotacionado nas paredes da vagina. Após, o material

foi imediatamente transferido para uma lâmina de vidro previamente limpa. A fixação das lâminas foi realizada com álcool absoluto e posteriormente coradas com Panótico Rápido®. As amostras foram examinadas em microscopia de luz, onde 100 células foram quantificadas e classificadas de acordo com a sua morfologia em células parabasais, intermediárias, superficiais e escamas de acordo com Johnston et al (2001).

4.4 Exame histológico

Após a OSH, amostras de tecido de ambos os cornos uterinos foram colhidas e fixadas em solução tamponada a 10% de fosfato de formoldeído por 24 horas e processados rotineiramente para análise histológica. As amostras foram incluídas em parafina, cortadas até 5 µm e coradas com HE (hematoxilina/eosina) e examinadas histologicamente usando o critério previamente descrito por Banks (1992).

4.5 Avaliação da expressão gênica dos receptores de hormônios sexuais por meio de PCR em tempo real

As análises de expressão gênica dos receptores de estrógeno e progesterona foram realizadas por meio de tecido endometrial, no Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana no Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da UNESP em Botucatu-SP.

4.5.1 Extração do RNA e reação de transcrição reversa

Amostras uterinas foram coletadas e armazenadas individualmente em nitrogênio líquido até o momento da extração do RNA. O RNA total foi recuperado a partir de 50-100 mg de tecido uterino imerso em 1ml de solução Trizol (Invitrogen®). Cada amostra de tecido uterino foi triturada em homogenizador de tecidos (Polytron UltraTurrax T-25), incubada em clorofórmio 20%, homogeneizada e centrifugada. O sobrenadante foi transferido para outro tubo em que foi adicionado solução de clorofórmio:butanol (4:1), homogeneizado e centrifugado. O RNA foi precipitado com isopropanol (-20°C) e após centrifugação o *pellet* foi lavado com etanol 75%, seco e diluído em água ultra-pura tratada com dietil pirocarbonato

(DEPC). A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria (Biophotometer-Eppendorf®).

Após a mensuração, 1µg do RNA total de cada amostra uterina foi transcrita reversamente em reações de 20 µl contendo: 1 µl de *SuperScript* III (Invitrogen™) (200U/µl), 1µl de oligo dT(12-18Ts) (10µM), 2 µl de dNTPs (2,5mM cada), 2µl de DTT (0,1 M), 1 µl de RNaseOUT® (40 U/µl; Invitrogen™) e 4 µl de tampão 5X. As reações foram realizadas a 42°C por 15 minutos, 50°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos para inativação da enzima.

4.5.2 Caracterização do perfil de expressão gênica por PCR em tempo real

As análises de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o sistema de detecção ABI Prism® 7500 (*Applied Biosystems*), em placas de 96 poços seladas com adesivos ópticos (*Applied Biosystems*). O desenho e a construção dos *primers* para os genes dos receptores de estrógeno alfa (α), beta (β) (ER- α e ER- β respectivamente) e progesterona (PR) foram realizados com o auxílio do programa *Primer Express*™ (*Applied Biosystems*). Como gene referência utilizou-se a proteína ribossomal S5 (RPS5) descrita Brinkhof et al. (2006). Na Tabela 1, são apresentados às seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR em tempo real para amplificação dos genes ER- α , ER- β , PR e RPS5.

Todas as reações foram preparadas utilizando *Power Sybr Green*® PCR *Master Mix* (*Applied Biosystems*), em 25 µl de volume total. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto seguido por curva de dissociação.

TABELA 1. Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no PCR em tempo real para amplificação dos genes ER α , ER β , PR e RPS5.

Genes	Seqüências	Fragmentos
RPS5	S 5' TCACTGGTGAGAACCCCT 3' A 5' CCTGATTCACACGGCGTAG 3'	141pb
Er α	S 5' AAC GCC TCT GTC TCG TCT GT 3' A 5' GTA CTC AAT GCT CCC CTG GA 3'	113pb
ER β	S 5' TCCCAGCAGTGCCAATAACTCAGA 3' A 5' TGCATACAGAAGTGACGACTGGCA 3'	127pb
PR	S 5' CAAACATGTCAGTGGGCAGATGC 3' A 5' CTGCCACATGGTGAGGCATAATGA 3'	106pb

S = "sense"; A = "antisense"; pb = pares de bases

4.5.3 Determinação da expressão gênica relativa

A expressão relativa dos produtos de PCR foi determinada pela equação descrita por Pfaffl et al. (2001):

$$Raz\tilde{a}o = \frac{(E_{alvo})^{\Delta Ct_{alvo}(controle- amostra)}}{(E_{refer\tilde{e}ncia})^{\Delta Ct_{refer\tilde{e}ncia}(controle- amostra)}}$$

em que,

Razão = é a expressão relativa entre o gene alvo e o gene referência;

E_{alvo} = é a eficiência da reação de PCR em tempo real do gene alvo;

$E_{refer\tilde{e}ncia}$ = é a eficiência da reação de PCR em tempo real do gene referência,

ΔCt_{alvo} = é desvio de (Ct do controle – amostra do gene alvo transcrito);

$\Delta Ct_{refer\tilde{e}ncia}$ = é desvio de (Ct do controle – amostra do gene referência transcrito).

A média de Ct das amostras de cadela do grupo saudáveis em anestro, foi utilizada como grupo controle para as comparações entre os outros grupos amostrais.

As eficiências (E) de cada reação de amplificação foram calculadas como descrita por Rasmussen (2001) segundo a equação:

$$E=10^{-1/slope}$$

em que,

slope = é o coeficiente de regressão da curva padrão gerada pela diluição seriada e calculada automaticamente pelo programa de análise ABI Prism® 7500 (*Applied Biosystems*).

Para a construção da curva padrão, quatro diluições seriadas (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) foram produzidas para padronização das condições de amplificação. Todas as amostras uterinas e as diluições padrão foram corridas em duplicata. A eficiência de cada gene foi calculada pela média das eficiências individuais de cada tubo utilizando os dados de fluorescência por ciclo de amplificação no programa *LinRegPCR* (RAMAKERS et al., 2003).

4.6 Exame de imunoistoquímica para receptores de estrógeno e progesterona

4.6.1 Padronização da técnica de imunoistoquímica

Os exames de imunoistoquímica foram realizados no Laboratório de Imunoistoquímica – Departamento de Patologia Veterinária da UNIFEOB em São João da Boa Vista/SP.

A padronização da técnica de imunoistoquímica foi testada e fundamentada no princípio da aplicação do polímero marcado com enzima *peroxidase horseradish* (HRP), um sistema livre do complexo estreptavidina-biotina. Para tal foram confeccionados cortes de tecido uterino com 4µm de espessura. Estes cortes foram distendidos em lâminas histológicas previamente sinalizadas em organosilano, com o objetivo de promover uma melhor adesão dos cortes teciduais às lâminas. Em seguida, as lâminas permaneceram em estufa durante 24 horas, sendo conservada a temperatura entre 55 e 58°C.

Subseqüentemente, as lâminas foram colocadas em uma cuba de vidro e diafanizadas em xilol, sendo realizados dois banhos: um de trinta minutos e outro de vinte minutos a 37°C. Ainda nessa fase, foram realizadas duas lavagens rápidas em álcool 95°, para eliminação do excesso de xilol, três passagens de cinco minutos em álcool absoluto, um banho de cinco minutos em álcool 95° e um em álcool 85° (cada banho tinha duração de 5 minutos). A fim de retirarem-se os pigmentos de formol, as lâminas permaneceram 10 minutos submersas em hidróxido de amônia a 10%. Para a hidratação dos cortes, o material foi lavado em água corrente por 10 minutos e banhado duas vezes em água destilada.

A recuperação antigênica constitui uma etapa essencial ao êxito da técnica de imunoistoquímica e tem o propósito de liberar os epítomos antigênicos do tecido, bloqueados pela solução fixadora (formol tamponado a 10%). Para a padronização da técnica e otimização dos anticorpos testados neste estudo (Tabela 2), empregaram-se as seguintes soluções tampão na recuperação em banho-maria a alta temperatura (95°C): a) citrato 10 mM, pH 6,0; e b) EDTA 100 mM, pH 8,0 (Tabela 3).

As lâminas foram organizadas paralelamente em cubas de vidro horizontal, submersas na solução tampão, pré-aquecida a 95°C e incubadas em banho-maria durante 20 minutos, na mesma temperatura. Após rápido arrefecimento do material, seguiu-se com lavagem em água corrente (10 minutos) e duas passagens em água destilada.

A fase seguinte consistiu do bloqueio da peroxidase endógena, por incubação das lâminas em solução de água oxigenada 10 volumes, durante 20 minutos e com uma troca desta solução no intervalo de dez minutos. O material foi então lavado em água corrente por 10 minutos, mais duas vezes em água destilada e duas vezes em TRIS; 5 minutos cada lavagem.

Na seqüência testaram-se os anticorpos primários para receptores de estrógeno e progesterona, diluídos em solução de BSA a 1%, inicialmente na concentração de 1:50. Após a diluição, cobriram-se os cortes com os anticorpos primários, os quais foram incubados em câmara úmida por 18 horas (“*overnight*”) à temperatura de 4°C.

TABELA 2. Anticorpos e suas características de marcação celular utilizados na padronização da técnica de imunistoquímica

Anticorpo	Tipo	Laboratório	Marcação
E ₂ ''	M- clone 1D5	Dako/M7047	N**/EE
E ₂ ''	Policlonal	Labvision/ER/Ab17	N**/EE
Pg [†]	M-clone PgR636	Dako/M3569	N**/EE
Pg [†]	Monoclonal/Ab8	Labvision/PgR	N**/EE
E ₂ ''	Clone PPG5/10	Dako/M7292	N**/EE
Pg [†]	Clone 16	Novocastra/NCL-L-PGR 312	N**/EE

''E₂: Receptor de Estrógeno; [†]Pg: Receptor de progesterona; M-clone: Ac Monoclonal; N**/EE: Marcação nuclear epitelial e estromal.

TABELA 3. Diluição, recuperação antigênica e soluções tampão utilizadas na padronização da técnica de imunistoquímica

Anticorpo	Diluição testada	Recuperação	Soluções tampão
E ₂ (1D5)	1:50	BM	C, EDTA
E ₂ (policlonal)	1:50	BM	C, EDTA
Pg (PgR636)	1:50	BM	C, EDTA
Pg (monoclonal)	1:50	BM	C, EDTA 0
E ₂ (M7292)	1:50	BM	C, EDTA
E ₂ (M7292)	1:50	PP	C, EDTA
Pg (PGR 312)	1:50	BM	C, EDTA
Pg (PGR 312)	1:50	PP	C, EDTA

BM: Banho-Maria; C: Citrato, pH6,0; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético, pH8,0.

Na fase seguinte realizaram-se dois banhos de TRIS, de 5 minutos cada e incubação em um *kit* de amplificação EnVision + Dual Link System HRP (Dako K4061), durante 30 minutos, em câmara úmida, a temperatura ambiente. Ao final da incubação, as lâminas permaneceram em TRIS.

Para a visualização da reação, os cortes foram cobertos com solução de diaminobenzidina (Liquid DAB+Substrate - Dako 3468), por cinco minutos e, logo após, lavados duas vezes por cinco minutos cada lavagem, em TRIS, para interrupção da reação. Em seguida, o material foi lavado em água corrente, por 10 minutos e lavado em água destilada. Prosseguiu-se com a contra-coloração em Hematoxilina de Mayer, 5 minutos, lavagem em água corrente por 10

minutos, passagem em água destilada e desidratação. Nesta última etapa realizaram-se banhos em álcool 85°, 95°, absoluto I, II, III, xilol I, II e III, com tempo mínimo de três minutos para cada banho.

A finalização da técnica compreendeu a cobertura dos cortes com resina sintética (Permunt – Fisher Scientific) e com lamínulas de vidro.

Foram analisados dois campos de cada camada, sendo que em cada campo todas as células foram contadas, diferenciando as marcadas das não marcadas.

4.7 Análises estatísticas

As análises descritivas foram realizadas por meio de procedimento PROC UNIVARITE do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1 (SAS, 1995), visando obter as estatísticas descritivas para as diferentes variáveis avaliadas, bem como, a verificação das pressuposições anteriores às análises inferenciais propriamente ditas.

Os dados relativos às dosagens séricas do hormônio avaliados e às quantificações das expressões gênicas para os receptores hormonais obtidas por meio do RT-PCR, foram analisados considerando-se os grupos comparativos e as fases do ciclo estral por meio da análise de variância, utilizando o procedimento PROC GLM, do programa acima citado, de acordo com o modelo estatístico abaixo:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + F(G)_{j(i)} + e_{ijk}$$

em que,

y_{ijk} = é o nível de dosagem sérica dos hormônios ou da quantificação das expressões gênicas para os receptores hormonais observado no animal k , na fase do ciclo estral j , pertencente ao grupo comparativo i ;

μ = constante inerente a todas as observações;

G_i = efeito de i -ésimo grupo comparativo, sendo $i=1$ (animais controle/normais) e 2 (animais experimentais/com piometra);

$F(G)_{j(i)}$ = efeito da j -ésima fase do ciclo estral, dentro de cada grupo i , sendo $j = 1$ (pro-estro), 2 (estro), 3 (diestro) e 4 (anestro);

e_{ijk} = efeito aleatório residual associado ao nível de dosagem sérica dos hormônios ou da quantificação das expressões gênicas para os

receptores hormonais observado no animal k , na fase do ciclo estral j , pertencente ao grupo i ;

Os dados relativos às quantificações dos receptores obtidos por meio de imunistoquímica, avaliados segundo os grupos comparativos, fases do ciclo estral e camadas do tecido uterino, foram também analisados por meio da análise de variância, utilizando o mesmo procedimento e programa acima citado, porém considerando-se o modelo estatístico abaixo:

$$y_{ijkl} = \mu + G_i + F(G)_{j(i)} + C(F(G))_{k(j(i))} + e_{ijkl}$$

em que,

y_{ijkl} = é a porcentagem de células imunopositivas para os receptores hormonais avaliados imunistoquimicamente, observado no animal l , na camada uterina k , na fase do ciclo estral j , pertencente ao grupo comparativo i ;

μ = constante inerente a todas as observações;

G_i = efeito de i -ésimo grupo comparativo, sendo $i=1$ (animais controle/normais) e 2 (animais experimentais/com piometra);

$F(G)_{j(i)}$ = efeito da j -ésima fase do ciclo estral, dentro de cada grupo i , sendo $j = 1$ (pro-estro), 2 (estro), 3 (diestro) e 4 (anestro);

$C(F(G))_{k(j(i))}$ = efeito da k -ésima camada uterina, dentro de fase do ciclo estral j e dentro de cada grupo i , sendo $k = 1$ (epitélio superficial), 2 (epitélio glandular), 3 (estroma) e 4 (miométrio);

e_{ijkl} = efeito aleatório residual associado à porcentagem de células imunopositivas para os receptores hormonais avaliados imunistoquimicamente, observado no animal l , na camada uterina k , na fase do ciclo estral j , pertencente ao grupo comparativo i ;

Na avaliação das porcentagens de células imunopositivas para os receptores hormonais avaliados, utilizou-se a transformação de escala dos dados para “arco-seno raiz de porcentagem de células imunopositivas”, procedendo-se à análise de variância e o procedimento para comparações múltiplas com os transformados. Para apresentação dos resultados os dados

foram expressos na escala original, aplicando as operações inversas à transformação, conforme recomendações de Banzatto e Kronka (2006).

Em caso de resultados significativos ($P < 0,05$) para as fontes de variações avaliadas nas análises de variância anteriormente citadas, adotou-se como procedimento para comparações múltiplas o Teste t de Student.

Na avaliação das classificações realizadas com base na dosagem hormonal e nos exames citológicos, bem como, na avaliação das intensidades dos escores de marcação obtidos pelas técnicas de imunistoquímica, utilizou-se o método não-paramétrico de Qui-quadrado (χ^2) para verificação das freqüências observadas entre os grupos comparativos. Estas análises foram realizadas por meio PROC FREQ do programa acima descrito.

Para avaliação das possíveis relações entre as dosagens hormonais, quantificações das expressões gênicas para os receptores hormonais e para as quantificações dos receptores obtidos por meio de imunistoquímica, utilizou-se análises de correlação Momento-Produto de *Pearson* por meio do procedimento PROC CORR do programa anteriormente citado.

5. RESULTADOS

As estimativas de média geral de idade (em meses) dos 51 animais, bem como o erro padrão foi de $68,88 \pm 4,93$ meses. A idade mínima foi de 6,00 meses e a máxima de 144,00 meses. Para o peso dos animais, verificou-se uma variação entre 2,30 kg e 52,00 kg, com média e erro padrão de $18,83 \pm 2,00$ kg, respectivamente. As informações individuais relacionadas às idades, raças, peso, bem como, os níveis de progesterona sérica (em ng/ml), a classificação por meio dos níveis de progesterona sérica e a classificação pela citologia vaginal, utilizando a recomendações de Feldman e Nelson (2004).

5.1 Avaliação das dosagens hormonais de progesterona e estradiol séricos

A técnica de radioimunoensaio em fase sólida, por meio do *kit* comercial de estradiol utilizado, não permitiu obtenção das estimativas dos níveis de estradiol séricos nas diferentes fases do ciclo estral. Por este motivo as informações relacionadas às dosagens de estradiol foram retiradas deste trabalho.

Os níveis de progesterona para os 51 animais variaram entre 0,11 e 38,00 ng/ml, com média e erro padrão de $7,46 \pm 1,52$ ng/ml, respectivamente.

A análise de variância revelou resultado altamente significativo ($P < 0,01$) dos níveis de progesterona para a fonte de variação fases do ciclo estral dentro dos grupos comparativos.

As estimativas de médias e erros padrão para as dosagens de progesterona nas diferentes fases do ciclo estral, dos animais do grupo controle e do grupo experimental, encontram-se na Tabela 4.

Na Tabela 4 verifica-se que, para os animais normais, resultados significativos ($P < 0,01$) foram observados entre a fase de diestro e as demais fases. As fases de anestro, pro-estro e estro não diferiram entre si ($P > 0,05$). Para os animais com piometra, as fases de diestro e anestro demonstraram diferenças significativas ($P < 0,01$).

Não foram verificadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre as dosagens de progesterona dos animais normais e com piometra para a fase de anestro.

TABELA 4. Estimativas de médias e erros padrão para as dosagens de progesterona nas diferentes fases do ciclo estral, dentro de cada grupo comparativo avaliado

Fase do ciclo estral	Animais Normais	Animais com piometra
	MED±EP	MED±EP
Anestro	0,38±0,06 b,A	0,57±0,20 b,A
Pro-estro	1,41±0,180 b	
Estro	3,26±0,55 b	
Diestro	24,79±3,84 a,A	10,55±2,61 a,B

¹ Médias em uma mesma coluna e seguida por uma mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de *t* Student;

² Médias em uma mesma linha e seguida por uma mesma letra maiúscula, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de *t* Student.

Para a fase de diestro foi observado um resultado significativo ($P<0,01$) em relação aos grupos comparativos: os níveis de progesterona associados aos animais normais foram maiores em relação aos animais acometidos com piometra (Figura 1).

5.2 Avaliação da citologia vaginal e histopatologia uterina

As amostras obtidas por meio de *swabs* vaginais foram coradas, examinadas e classificadas de acordo com a morfologia das células do epitélio vaginal. Com base nos resultados, os animais foram classificados de acordo com a fase do ciclo estral, sendo que no grupo de animais controle, oito fêmeas apresentavam-se em pro - estro, cinco em estro, cinco em diestro e 12 em anestro. Para o grupo de animais com piometra foram observados 17 animais em diestro e quatro animais em anestro. Observou-se que a classificação das fases do ciclo estral segundo os níveis de progesterona e os achados citológicos foram ligeiramente diferentes para animais normais. Entretanto, não

foram detectadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre as ocorrências nas diferentes classificações, segundo o Teste de Qui-quadrado.

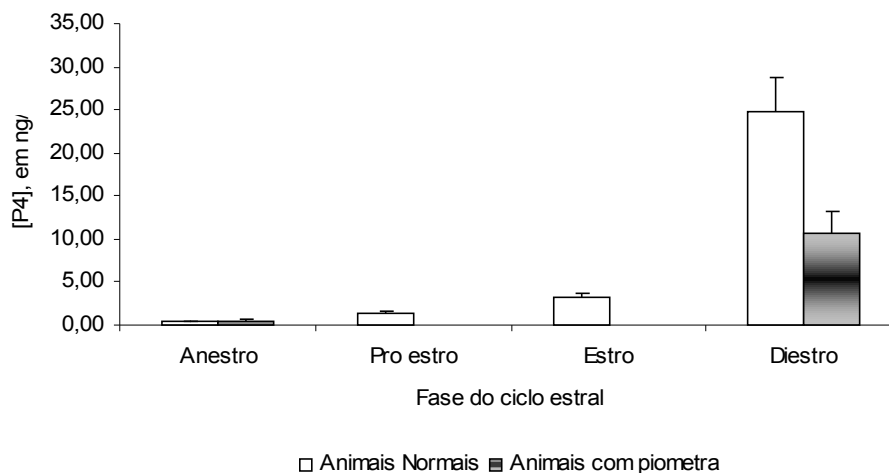


FIGURA 1. Estimativas de médias e erros padrão para os níveis de progesterona (ng/ml), de acordo com a fase do ciclo estral e dentro de cada grupo comparativo

Para animais com piometra, não foram observadas discrepâncias entre as duas classificações (citológica *versus* progesterona). Nas Figuras 2 e 3 são apresentadas às freqüências de ocorrências observadas segundo a classificação com base no nível de progesterona e nos achados da citologia vaginal, para animais normais e com piometra respectivamente.

As amostras de útero foram examinadas histologicamente conforme ilustram as figuras 4 e 5 e posteriormente classificados nos seguintes graus de HEC: discreto, moderado, severo e sem HEC. Nos animais clinicamente saudáveis 6,6% (N=2) apresentaram grau discreto de HEC e 93,4% (N=28) não apresentaram nenhum grau de HEC. Nos animais portadores de piometra, foram observados 23,8% (N=5) com HEC discreta, 28,6% (N=6) com HEC moderada e 47,6% (N=10) com HEC severa sendo que estes animais apresentavam-se em anestro ou diestro, conforme observado na Figura 6.

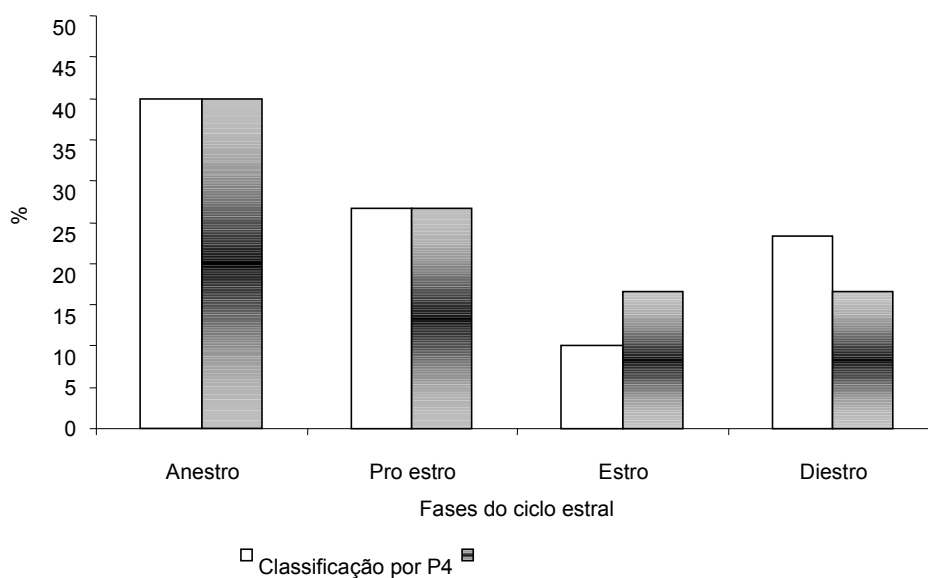


FIGURA 2. Frequências de ocorrências de fases do ciclo estral nos animais do grupo controle, segundo os métodos de classificação

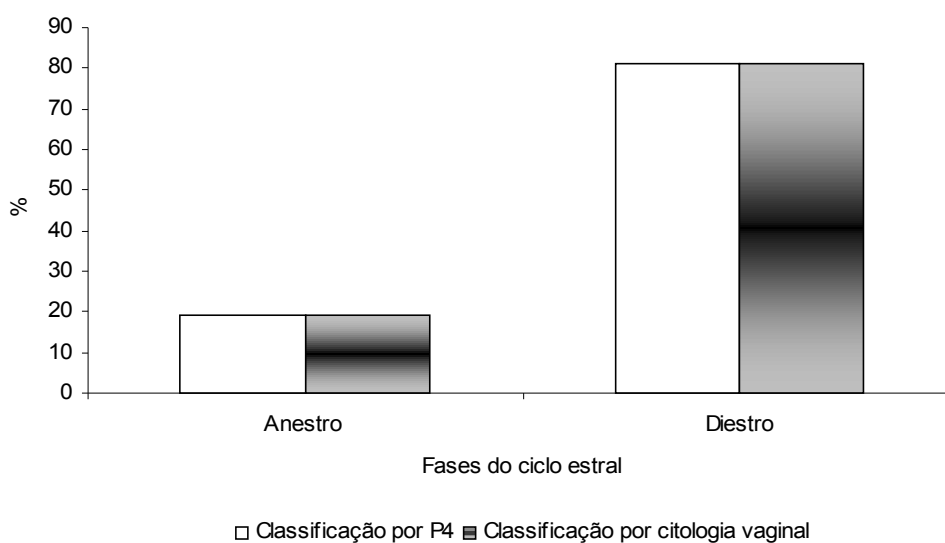


FIGURA 3. Frequências de ocorrências de fases do ciclo estral nos animais do grupo experimental, segundo os métodos de classificação – citologia vaginal e concentrações de progesterona sérica

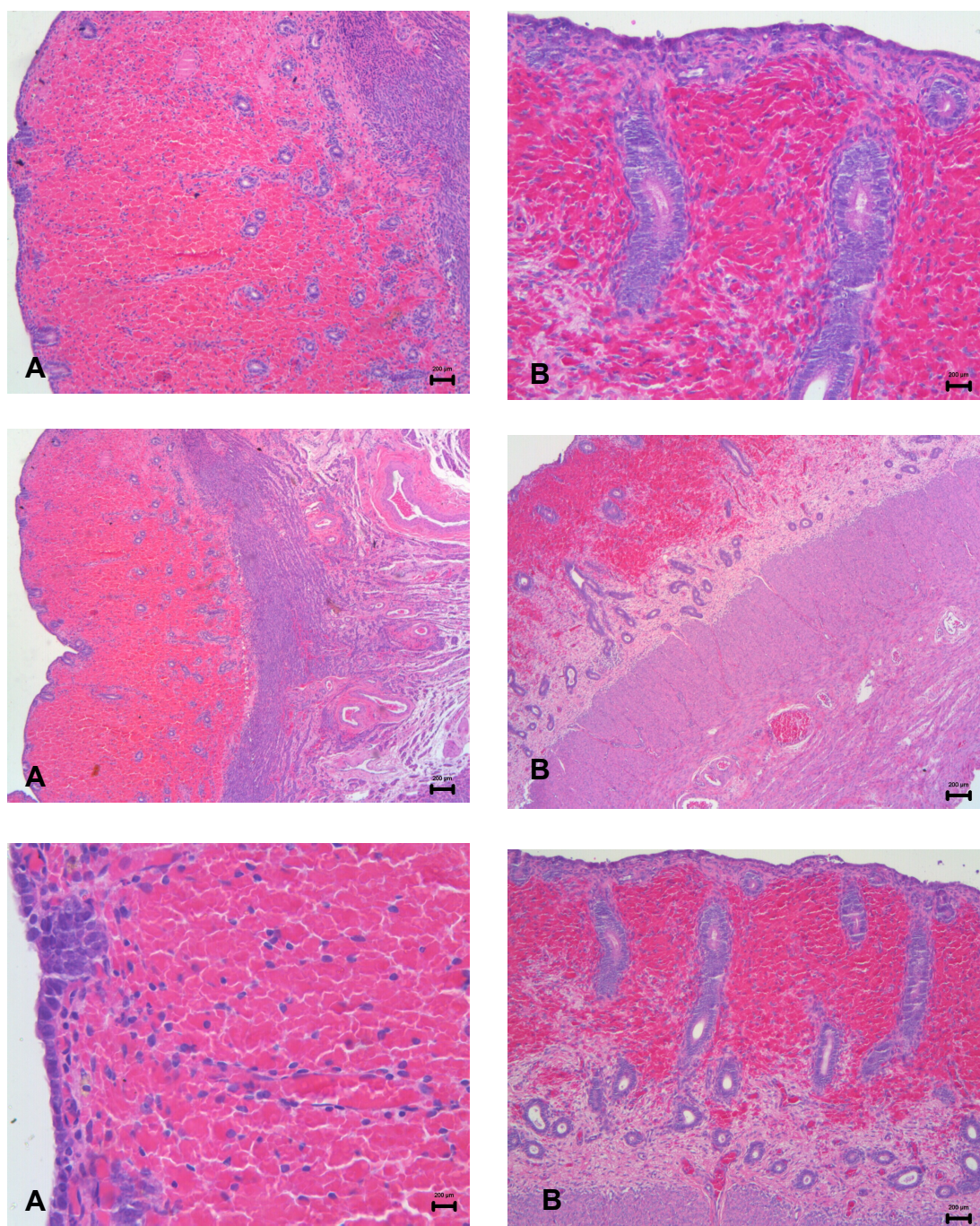


FIGURA 4. Fotomicrografia de endométrio de cadelas do grupo controle: A. fase de anestro; B. fase de pro-estro

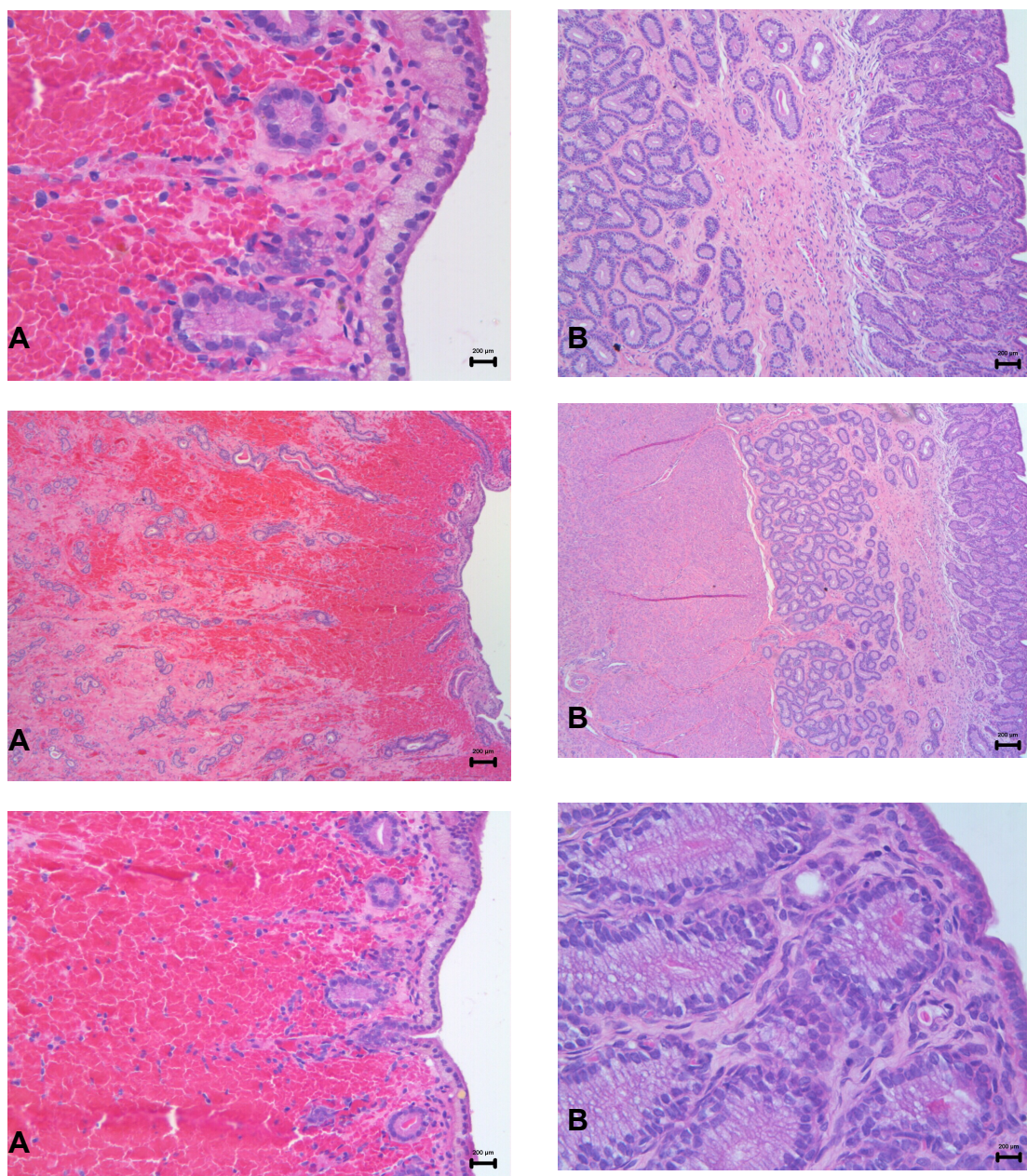


FIGURA 5. Fotomicrografia de endométrio de cadelas do grupo controle: A. fase de estro; B. fase de diestro

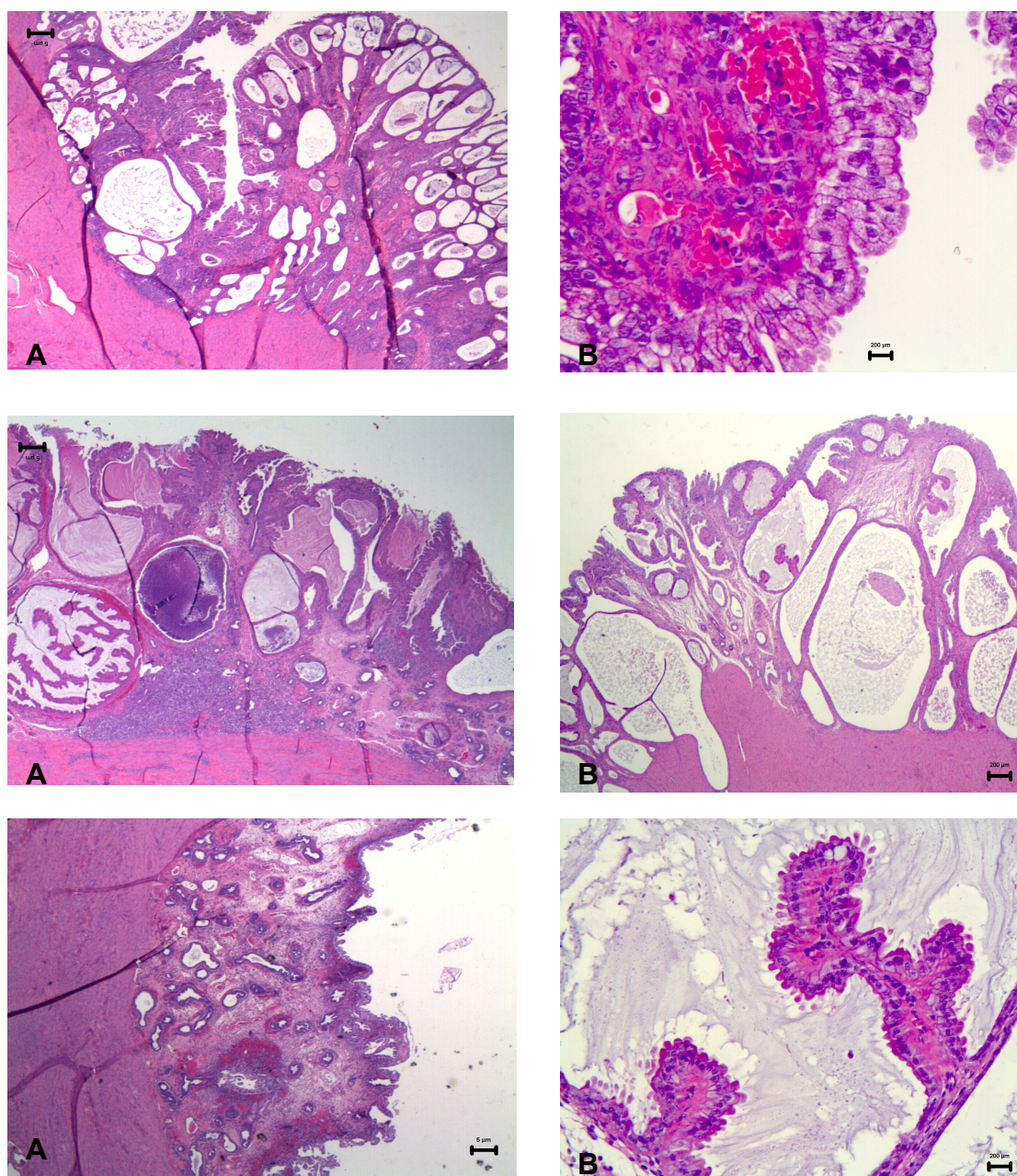


FIGURA 6. Fotomicrografia de endométrio de cadelas do grupo experimental:
A. fase de anestro; B. fase de diestro

5.3 Avaliação da expressão gênica dos receptores hormonais

Os números de amostras avaliadas e as estimativas de médias, desvios padrão, valores de mínimos e máximos para as expressões gênicas dos receptores de estrógeno alfa e beta (ER- α , ER- β) e o receptor de progesterona (PR), expressos em relação a quantidade de proteína ribossomal S5 (RPS), estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5. Número de observações (N), estimativas de médias (MED), erros padrão (EP), valores de mínimos (MIN) e máximos (MAX) para os receptores de estrógeno ER- α e ER- β , bem como, para o receptor de progesterona PR avaliados

Receptor	N	MED	EP	CV	MIN	MAX
ER-α	36	0,67	0,99	146,90	0,01	5,34
ER-β	42	3,63	8,75	240,94	0,02	47,80
PR	44	0,84	0,71	84,70	0,00	2,88

Verifica-se na Tabela 5 que os números de observações avaliados não foram constantes em relação às análises de progesterona sérica (N=51). Este fato ocorreu em virtude das amostras utilizadas nas análises de expressão gênica não apresentarem, para algumas amostras, quantidades de mRNA suficientemente detectáveis para os receptores hormonais investigados. Entretanto, este fato não se traduziu em problema, uma vez que ocorreram repetições em todas as fases avaliadas e dentro dos grupos comparativos, conforme demonstrado na Tabela 6.

Nas análises de variância considerando as fontes de variação grupos comparativos e fases do ciclo estral dentro de cada grupo comparativo avaliado, não foram observados resultados significativos ($P > 0,05$) para os receptores ER- α e PR. Entretanto, para o receptor hormonal ER- β , foi verificado resultado altamente significativo ($P < 0,01$) para a fonte de variação fases do ciclo estral dentro de cada grupo comparativo avaliado.

TABELA 6. Distribuição das freqüências observadas para as análises dos receptores de estrógeno alfa e beta, bem como, para o receptor de progesterona (ER- α , ER- β e PR) avaliados por meio de RT-PCR, segundo o grupo comparativo e as fases do ciclo estral

Grupo Comparativo	Receptor avaliado	Fase do ciclo estral			
		Anestro	Pro-estro	Estro	Diestro
Grupo controle	ER- α	4	7	3	4
	ER- β	7	7	3	6
	PR	9	7	3	6
Grupo experimental	ER- α	4	---	---	14
	ER- β	4	---	---	15
	PR	4	---	---	15

As estimativas de médias e erros padrão para receptores de hormonais ER- α , ER- β e PR nas diferentes fases do ciclo estral e dentro de cada grupo comparativos avaliados, encontram-se na Tabela 7 e nas Figuras 7, 8 e 9.

Observa-se pela Tabela 7 e Figura 7 que as taxas expressões gênicas do receptor ER- α oscilaram entre $0,11 \pm 0,49$ e $0,66 \pm 0,49$ nas diferentes fases do ciclo estral para animais normais e de $0,90 \pm 0,49$ a $1,05 \pm 0,26$ para animais com piometra, nas fases de anestro e diestro, respectivamente. Destaca-se que, apesar das taxas de expressão gênica terem sido ligeiramente superiores em animais acometidos pela piometra, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para as fontes de variação avaliadas.

Para as taxas de expressões gênicas relacionadas ao receptor ER- β , verificou-se que, para animais normais, menores taxas de expressão desse receptor ocorreram nas fases de anestro, pro - estro e estro, as quais não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$).

TABELA 7. Estimativas de médias e erros padrão para receptores hormonais ER- α , ER- β e PR, segundo as diferentes fases do ciclo estral, dentro de cada grupo comparativo avaliados

Fase do ciclo estral ¹	Grupo controle	Grupo experimental
	MED±EP	MED±EP
	ER-α	
Anestro	0,11±0,49 a,A	0,90±0,49 a,A
Pro-estro	0,66±0,49 a	
Estro	0,20±0,98 a	
Diestro	0,19±0,37 a,A	1,05±0,26 a,A
	ER-β	
Anestro	0,23±2,66 b,A	0,22±3,52 a,A
Pro-estro	2,55±2,88 b	
Estro	1,72±4,07 b	
Diestro	16,23±2,66 a,A	1,06±1,82 a,B
	PR	
Anestro	0,82±0,23 a,A	1,25±0,34 a,A
Pro-estro	1,24±0,28 a	
Estro	1,30±0,40 a	
Diestro	0,77±0,26 a,A	0,53±0,18 a,A

¹ Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste *t* de Student;

² Médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra maúscula, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste *t* de Student.

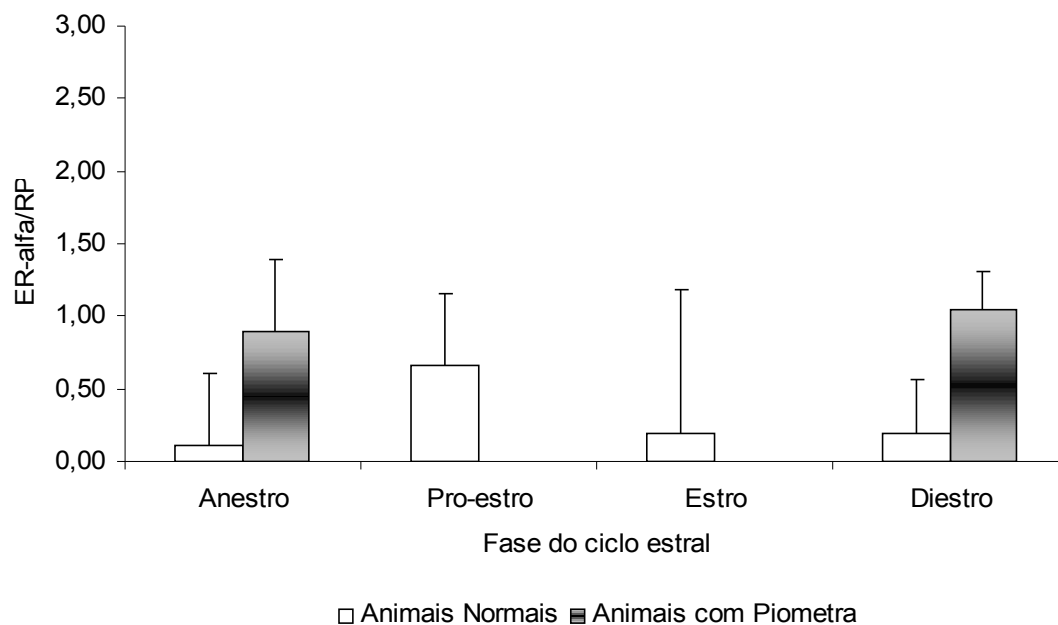


FIGURA 7. Estimativas de médias e erros padrão para as expressões gênicas de ER- α , de acordo com a fase do ciclo estral e dentro de cada grupo comparativo.

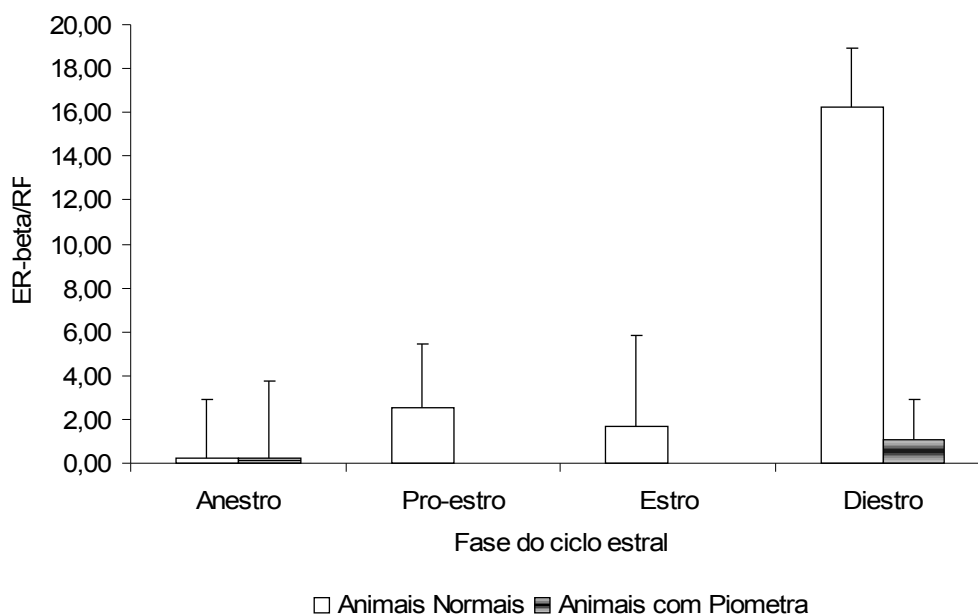


FIGURA 8. Estimativas de médias e erros padrão para as expressões gênicas de ER- β , de acordo com a fase do ciclo estral e dentro de cada grupo comparativo.

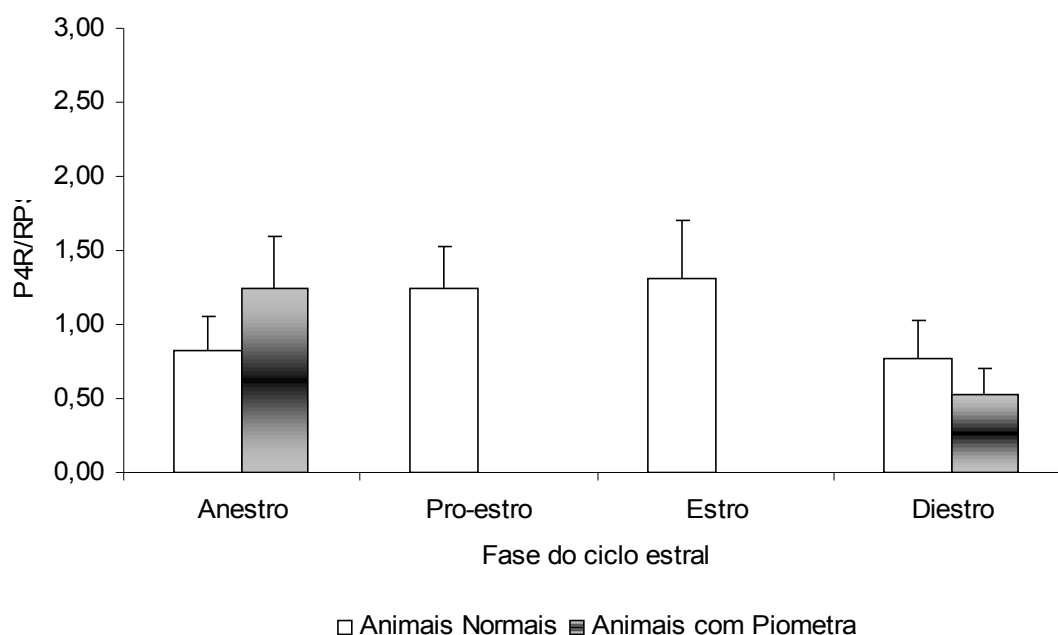


FIGURA 9. Estimativas de médias e erros padrão para as expressões gênicas de PR de acordo com a fase do ciclo estral e dentro de cada grupo comparativo

Entretanto, na fase de diestro, as taxas de expressões gênicas para o receptor ER- β em animais normais, aumentaram significativamente ($P < 0,01$) em relação às demais fases do ciclo estral, chegando a atingir 36.866 vezes mais transcritos para esse mesmo receptor, quando comparado com o grupo referência (animais normais em fase de anestro), conforme verificado na Tabela 7 e Figura 8.

Para o receptor hormonal PR, as taxas das expressões gênicas avaliadas, variaram de $0,82 \pm 0,23$ a $1,30 \pm 0,40$ nas diferentes fases do ciclo estral para animais normais. Já para os animais acometidos pela piometra, foram observadas variações de $0,53 \pm 0,18$ a $1,25 \pm 0,34$, nas fases em que a piometra se manifesta. Nota-se que, semelhantemente aos resultados verificados para o receptor ER- α , as taxas de expressão gênica foram também ligeiramente superiores em animais acometidos pela patologia, porém não foram detectadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para as fontes de variação avaliadas, conforme as Tabela 7 e Figura 9.

5.4 Avaliação imunoistoquímica dos receptores hormonais

5.4.1 Padronizações das técnicas de imunoistoquímica

A padronização da técnica de imunoistoquímica realizada com os clones de estrógeno M-1D5-Dako/M7047, P-Labvision/ER/Ab17 e de progesterona M-clone PgR636-Dako/M3569, M-Labvision/PgR/Ab8, Clone 16-Novocastra/NCL-L-PGR 312 proposta neste estudo e os testes para a otimização dos anticorpos (anti-estrógeno e anti-progesterona), não foram satisfatórios e definitivos quanto à diluição, recuperação antigênica e tampões testados. Entretanto utilizando para estrógeno o Clone PPG5/1-Dako/M7292, os resultados foram satisfatórios. As lâminas foram analisadas em sua totalidade por microscopia de luz conforme ilustram as Figuras 10 e 11.

5.4.2 Avaliação quantitativa das marcações obtidas pela técnica de imunoistoquímica

Os anticorpos utilizados no estudo imunoistoquímico para receptores de progesterona não apresentaram resultados satisfatórios, sendo as marcações classificadas como inespecíficas para os três anticorpos testados. Face a este acontecido, as análises relacionadas com receptor de progesterona avaliados por imunoistoquímica foram retirados deste trabalho. Para o anticorpo de estrógeno Anti-E2 clone PPG5/10 foram obtidas marcações específicas e satisfatórias, fato esse que permitiu análises considerando diferentes tecidos marcados, dentro das fases do ciclo estral e dentro de cada grupo comparativo estudado.

Os números de imagens avaliadas e as estimativas de médias, desvios padrão, valores de mínimos e máximos utilizados nas análises micromorfológicas, relacionadas às porcentagens de células imunopositivas para o receptor hormonal de estrógeno (em escala original e após a transformação de escala), bem como, os números médios de células quantificadas por campo de

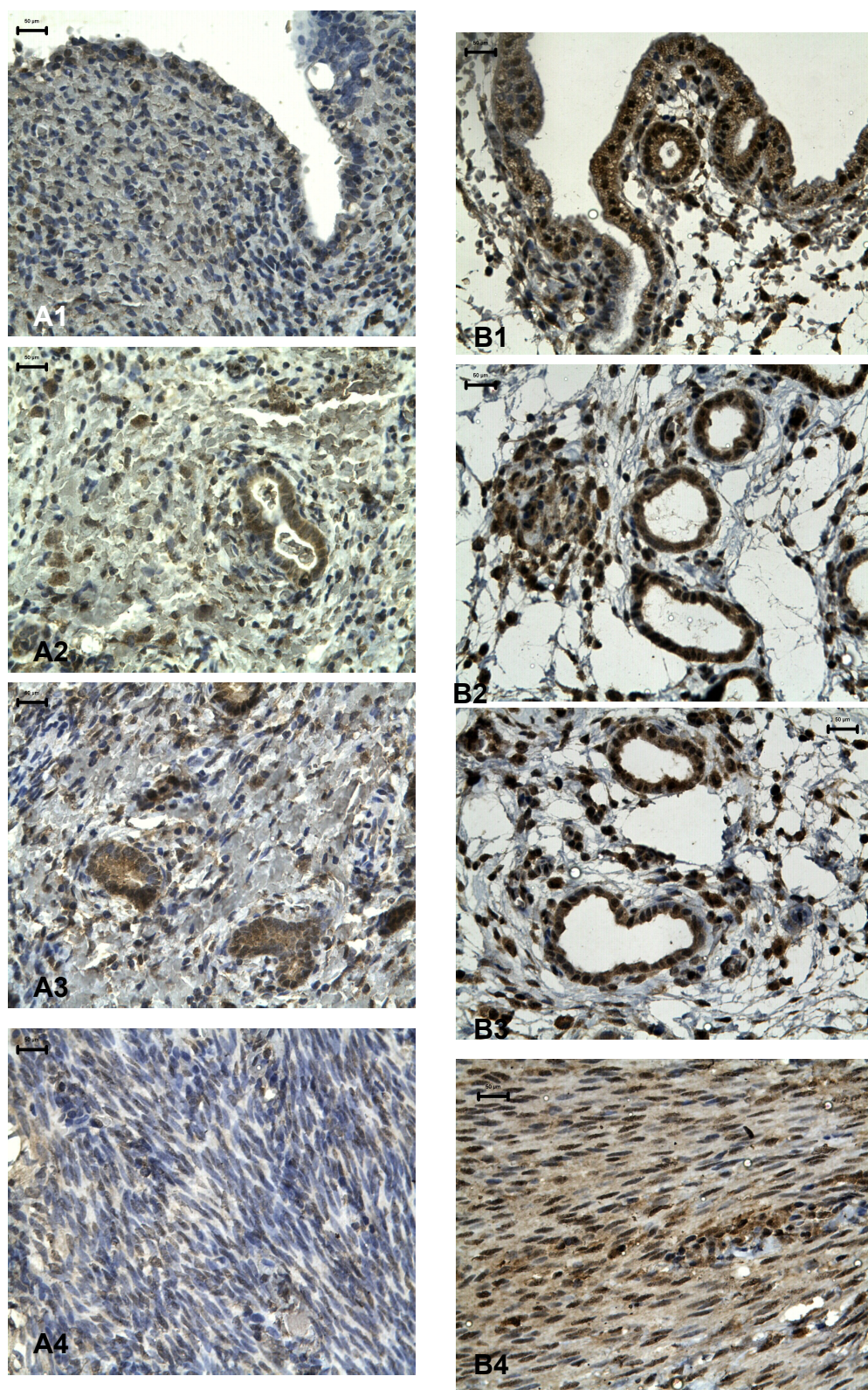


FIGURA 10 Fotomicrografia das diferentes camadas de endométrio em cadelas, na fase de anestro, nos grupos controle (A) e experimental (B): 1. Epitélio superficial; 2. epitélio glandular; 3. estroma e 4 miométrio. Observar imunomarcção positiva. Anti-E2 clone PPG5/10 (DAKO/M792).

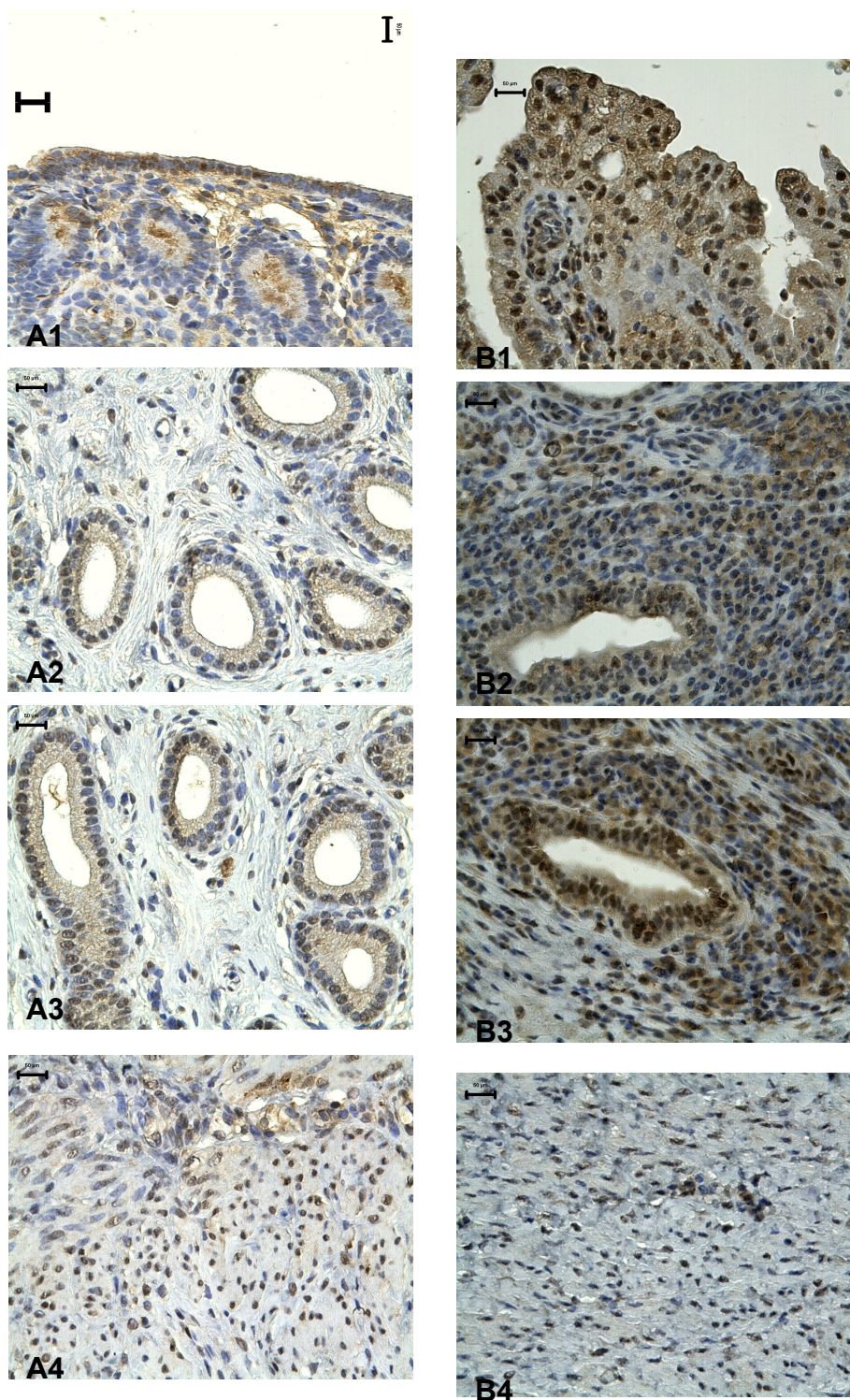


FIGURA 11 Fotomicrografia das diferentes camadas de endométrio em cadelas, na fase de diestro, nos grupos controle (A) e experimental (B): 1. Epitélio superficial; 2. epitélio glandular; 3. estroma e 4 miométrio. Observar imunomarcção positiva. Anti-E2 clone PPG5/10 (DAKO/M792).

avaliação microscópica, nos diferentes tecidos, fases do ciclo estral e grupos comparativos avaliados, estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8. Número de observações (N), estimativas de médias (MED), erros padrão (EP), valores mínimos (MIN) e máximos (MAX) para porcentagens de células imunopositivas para o receptor hormonal de estrógenos em escala original (PCPOSIT), após a transformação de escala (ASPCPOSIT) e os números médios de células contados (TOTCELS) por campo avaliado na microscopia

Variável	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
PCPOSIT ¹	195	53,72	22,75	42,34	1,14	98,88
ASPCPOSIT ²	195	47,61	14,53	30,51	6,14	83,92
TOTCELS ³	195	213,24	180,36	84,58	32,00	938,50

¹PCPOSIT= porcentagens de células imunopositivas para o receptor de estrógeno;

²ASPCPOSIT= arco-seno raiz da porcentagem de células imunopositivas para o receptor de estrógeno;

³TOTCELS=número de células quantificadas nos campos avaliados

A análise de variância considerando os efeitos de grupos comparativos, fase do ciclo estral dentro de cada grupo comparativo, bem como, tecidos dentro de cada fase e dentro de cada grupo comparativo, apresentou resultado altamente significativo ($P < 0,01$) para a fonte de variação tecidos dentro de cada fase e dentro de cada grupo comparativo. As estimativas de médias e erros padrão para as porcentagens de células imunopositivas para o receptor de estrógeno, dentro das diferentes fases e tecidos, segundo os grupos avaliados, são apresentados na Tabela 9 e Figura 12.

Avaliando os animais normais dentro de cada fase e tecido, verificou-se que nos animais em anestro, pro-estro e estro não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as porcentagens de células imunopositivas para o receptor de estrógeno, nos tecidos epitelial glandular, estromal e miométrio.

Tabela 9. Estimativas de médias e erros padrão das porcentagens de células imunopositivas para o receptor de estrógeno, dentro das diferentes fases e tecidos, segundo os grupos comparativos avaliados

Fase do ciclo estral-Tecido ²	Animais Normais ¹		Animais com Piometra ¹	
	MED	± EP	MED	± EP
Anestro-Epitélio Superficial	25,34	± 2,85 b B	73,12	± 4,39 a A
Anestro-Epitélio Glandular	40,60	± 2,84 a B	61,65	± 4,44 a A
Anestro-Estroma	37,09	± 2,86 a,b B	59,04	± 4,42 a A
Anestro-Miométrio	49,48	± 3,42 a B	74,87	± 4,36 a A
Pro-estro- Epitélio Superficial	29,38	± 3,15 b		
Pro-estro- Epitélio Glandular	39,96	± 3,12 a,b		
Pro-estro-Estroma	44,28	± 3,15 a,b		
Pro-estro-Miométrio	56,23	± 3,98 a		
Estro- Epitélio Superficial	22,83	± 5,08 b		
Estro- Epitélio Glandular	33,90	± 5,09 a,b		
Estro-Estroma	46,07	± 5,04 a,b		
Estro-Miométrio	47,71	± 5,27 a		
Diestro-Epitélio Superficial	28,88	± 3,35 c B	79,77	± 2,32 a A
Diestro- Epitélio Glandular	54,20	± 3,31 a B	75,06	± 2,26 a A
Diestro-Estroma	35,97	± 3,30 b,c B	64,45	± 2,15 b A
Diestro-Miométrio	48,04	± 3,31 a,b B	78,96	± 2,13 a A

¹ Médias em uma mesma linha, dentro de um mesmo tecido e grupo, seguidas por uma mesma letra maiúscula, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste *t* de Student

² Médias em uma mesma coluna, dentro de mesma fase do ciclo estral e grupo, seguidas por uma mesma letra minúscula, não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste *t* de Student

Entretanto na fase de diestro para animais normais, os tecidos com maiores porcentagens de células imunopositivas foram o epitelial glandular e o miométrio, as quais não exibiram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre si.

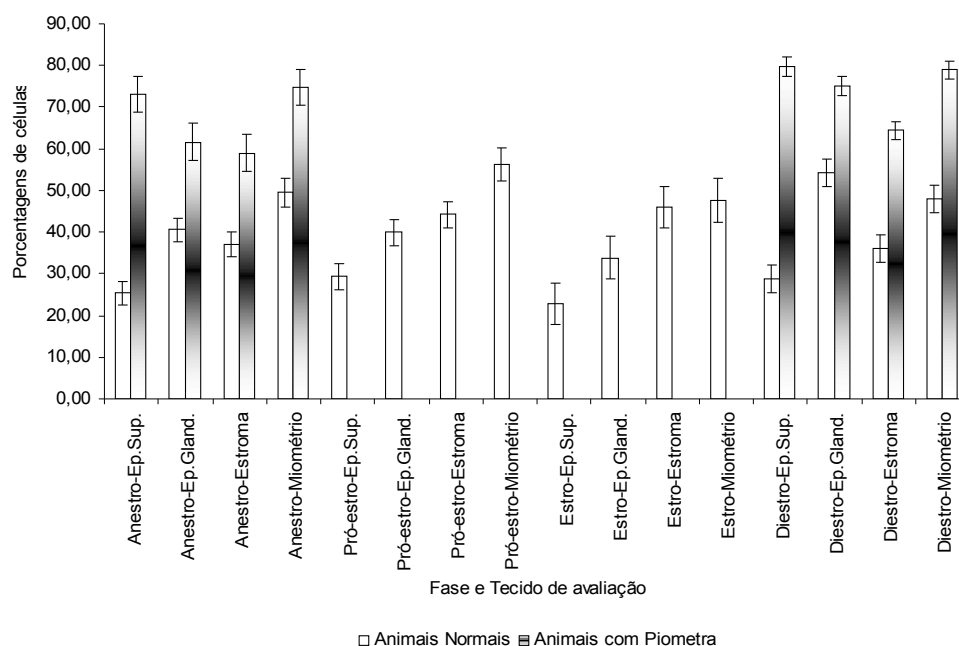


Figura 12. Porcentagens de células imunopositivas para o receptor de estrógeno, dentro das diferentes fases do ciclo estral e tecidos, bem como, em cada grupo avaliado

Para animais com piometra e em anestro, não foram verificados resultados significativos ($P > 0,05$) entre os tecidos avaliados. Porém na fase de diestro o tecido estromal apresentou porcentagens de células imunopositivas para o receptor de estrógeno significativamente inferior ($P < 0,01$) em relação aos demais tecidos.

Avaliando-se os grupos comparativos dentro de uma mesma fase e tecido, notou-se que tanto no anestro quanto no diestro os animais acometidos pela piometra diferiram significativamente ($P < 0,01$) quando comparados com animais normais, para todos os tecidos avaliados.

Os escores de marcação obtidos por microscopia óptica apresentaram resultados significativos pelo Teste de Qui-quadrado ($P < 0,01$), quando considerados todos os animais avaliados ($N = 51$) e os grupos comparativos. Foram observados que 20,41% demonstraram escores de marcação 1 e 36,73% apresentaram escores de marcação 2 entre os animais controles (normais). Não foram observados animais do grupo controle (normais) com escore 3 (0,0%). Contudo, animais acometidos pela piometra, foram verificados

escores 1 (4,08%), 2 (20,41%) e 3 (18,37%), em relação ao total de animas avaliados nos grupos comparativos (controle e experimental)

5.5 Estimativas de correlações entre as avaliações hormonal de progesterona, da expressão gênica dos receptores hormonais e das quantificações obtidas pela técnica de imunistoquímica

As estimativas dos coeficientes de correlação momento-produto de *Pearson* entre as dosagens hormonal de progesterona sérica, da expressão gênica dos receptores hormonais ER- α , ER- β e PR, bem como, as quantificações nos diferentes tecidos obtidos pela técnica de imunistoquímica, segundo os grupos controle (animais normais) e experimental (animais com piometra), são apresentados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

Na Tabela 10, observa-se que as estimativas de correlações obtidas entre as variáveis avaliadas nos animais do grupo controle (normais) foram, de maneira geral, de baixa a média magnitude, a exceção da correlação obtida entre as dosagens hormonal de progesterona sérica (P4) e da expressão gênica do receptor de estrógeno beta (ER- β), que assumiu o valor de 0,7114. As demais estimativas de correlações para os animais do grupo controle (normais) oscilaram de -0,4302 entre a porcentagem de células imunopositivas no epitélio superficial (PPEPSUP) e a expressão gênica para o receptor de progesterona (PR), até 0,4619 entre a porcentagem de células imunopositivas no epitélio superficial (PPEPSUP) e os escores de marcação obtidos pela técnica de imunistoquímica (ESCORE).

Na Tabela 11, observa-se que as estimativas de correlações obtidas para os animais do grupo experimental (com piometra) foram também, de maneira geral, de baixa a média magnitude, excetuando-se as correlações obtidas a porcentagem de células imunopositivas no epitélio superficial (PPEPSUP) e a porcentagem de células imunopositivas no epitélio glandular (PPEPGLA), entre porcentagem de células imunopositivas no epitélio glandular (PPEPGLA) e a porcentagem de células imunopositivas no estroma (PPESTR) e os escores de marcação obtidos pela técnica de imunistoquímica (ESCORE), os quais assumiram magnitudes de 0,7677, 0,7015 e 0,8272, respectivamente. As demais estimativas de correlações para os animais do grupo experimental (com

piometra) variaram de -0,2638 entre a porcentagem de células imunopositivas no miométrio (PPMIOM) e a expressão gênica para o receptor de progesterona (PR), até estimativa de 0,6982 entre a porcentagem de células imunopositivas no epitélio superficial (PPEPSUP) e a porcentagem de células imunopositivas no estroma (PPESTR), sendo as demais correlações intermediárias as essas estimativas.

TABELA 10. Estimativas dos coeficientes de correlação momento-produto de *Pearson* entre as dosagens hormonal de progesterona sérica, da expressão gênica dos receptores hormonais ER- α , ER- β e PR, bem como, as quantificações nos diferentes tecidos obtidos pela técnica de imunistoquímica, no animais do grupo controle (animais normais)

	P4	PPEPSUP	PPEPGLA	PPESTR	PPMIOM	ESCORE	ER-α	ER-β	PR
P4	1,0000								
PPEPSUP	0,0362	1,0000							
PPEPGLA	0,1984	0,1421	1,0000						
PPESTR	0,0073	0,4312	0,4159	1,0000					
PPMIOM	0,2322	0,0171	0,4478	0,3820	1,0000				
ESCORE	-0,1236	0,4619	-0,2004	0,2079	-0,0764	1,0000			
ER-α	-0,1278	0,1162	0,1514	0,1308	0,1812	0,1737	1,0000		
ER-β	0,7114	0,1225	0,1680	0,0199	0,4256	-0,0097	0,1284	1,0000	
PR	-0,1371	-0,4302	-0,0551	0,0489	0,1423	-0,1329	0,4495	-0,0137	1,0000

P4= dosagem hormonal de progesterona sérica; PPEPSUP= porcentagem de células imunopositivas no epitélio superficial; PPEPGLA= porcentagem de células imunopositivas no epitélio glandular; PPESTR= porcentagem de células imunopositivas no estroma; PPMIOM= porcentagem de células imunopositivas no miométrio; ESCORE= escore de marcação obtido pela técnica de imunistoquímica; ER- α = expressão gênica para o receptor de estrógeno alfa (PR); ER- β = expressão gênica para o receptor de estrógeno beta; PR= expressão gênica para o receptor de progesterona (PR)

TABELA 11. Estimativas dos coeficientes de correlação momento-produto de *Pearson* entre a dosagem hormonal de progesterona sérica, da expressão gênica dos receptores hormonais ER- α , ER- β e PR, bem como, as quantificações nos

diferentes tecidos obtidos pela técnica de imunistoquímica, no animais do grupo experimental (animais com piometra)

	P4	PPEPSUP	PPEPGLA	PPESTR	PPMIOM	ESCORE	ER-α	ER-β	PR
P4	1,0000								
PPEPSUP	-0,1018	1,0000							
PPEPGLA	0,1656	0,7677	1,0000						
PPESTR	0,1917	0,6982	0,7015	1,0000					
PPMIOM	0,0649	0,0671	0,2340	0,3108	1,0000				
ESCORE	0,0933	0,6591	0,6413	0,8272	-0,0232	1,0000			
ER-α	0,3401	0,0018	0,2091	0,1950	0,0326	0,2083	1,0000		
ER-β	-0,1220	0,2396	0,2568	-0,1836	0,1497	-0,2153	0,1217	1,0000	
PR	-0,0403	0,2210	-0,0211	0,2788	-0,2638	0,3055	-0,1726	-0,1449	1,0000

P4= dosagem hormonal de progesterona sérica; PPEPSUP= porcentagem de células imunopositivas no epitélio superficial; PPEPGLA= porcentagem de células imunopositivas no epitélio glandular; PPESTR= porcentagem de células imunopositivas no estroma; PPMIOM= porcentagem de células imunopositivas no miométrio; ESCORE= escore de marcação obtido pela técnica de imunistoquímica; ER- α = expressão gênica para o receptor de estrógeno alfa (PR); ER- β = expressão gênica para o receptor de estrógeno beta; PR= expressão gênica para o receptor de progesterona (PR)

5.6 Resumo dos resultados

- (i) Os níveis de progesterona sérica foram significativamente ($P < 0,01$) maiores nos animais do grupo controle (normais) do que nos animais do grupo experimental (com piometra) na fase de diestro;
- (ii) Os exames histológicos sugerem que a piometra é precedida da HEC, uma vez que 100,00% dos animais do grupo experimental (com piometra) apresentaram histologicamente algum grau de HEC. Este fato é reforçado quando se observa que, apenas 6,6 % de animais do grupo controle (normais) apresentaram HEC, porém sem ocorrência de piometra;
- (iii) As expressões gênicas de receptores ER- α não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os animais do grupo controle (normais) nas diferentes fases do ciclo estral e os animais do grupo experimental (com piometra);
- (iv) As expressões gênicas de receptores ER- β apresentaram diferenças significativas ($P < 0,01$), com os animais do grupo controle exibindo maiores taxas de transcrição quando comparados aos animais do grupo experimental, na fase de diestro;
- (v) As expressões gênicas de receptores PR não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os animais do grupo controle, nas diferentes fases do ciclo estral e os animais do grupo experimental;
- (vi) As porcentagens de células imunopositivas para o receptor de estrógeno, obtidos pela técnica de imunistoquímica, foram significativamente ($P < 0,01$) superiores nos animais do grupo experimental quando comparados aos animais controle, para as fases de anestro e diestro, e para todas as camadas do tecido uterino avaliados;
- (vii) A correlação obtida entre a concentração de progesterona sérica (P4) e a expressão gênica do receptor de estrógeno beta (ER- β), assumiu um valor de 0,7114, no grupo controle;
- (viii) A correlação entre a porcentagem de células imunopositivas no epitélio superficial (PPEPSUP) e a porcentagem de células imunopositivas no epitélio glandular (PPEPGLA), entre porcentagem de células imunopositivas no epitélio glandular (PPEPGLA) e a porcentagem de

células imunopositivas no estroma (PPESTR) e os escores de marcação obtidos pela técnica de imunohistoquímica (ESCORE), assumiram magnitudes de 0,7677, 0,7015 e 0,8272, respectivamente, no grupo experimental.

6. DISCUSSÃO

A média de idade dos animais com piometra encontradas neste trabalho foi de 8,1 anos e estão de acordo com os achados na literatura. Smith (2006) relatou que a incidência desta doença é maior em fêmeas acima de quatro anos de idade. Feldman e Nelson (2004) descreveram a ocorrência da afecção tradicionalmente em fêmeas de meia idade, acima de seis anos. Entretanto, segundo Johnston et al. (2001), há um aumento na prevalência desta enfermidade em cadelas acima de 7,5 anos de idade. Contudo, todos os autores consultados concordam que a exposição do endométrio a progesterona pode ser uma das possíveis causas do desenvolvimento desta doença.

As médias os níveis de progesterona no presente trabalho, para a classificação das diferentes fases do ciclo reprodutivo dos animais normais, seguiram dos limites descritos por Feldman e Nelson (2004). Um aspecto interessante observado neste trabalho, foi a verificação de diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os níveis de progesterona, dos animais do grupo controle, os quais apresentaram maiores níveis deste hormônio quando comparados com os animais do grupo experimental, na fase de diestro.

Cock et al. (1997) publicaram resultados referentes aos níveis de progesterona, estradiol e testosterona em animais normais e em animais com HCE. Os animais de ambos os grupos, foram classificados em três subgrupos: anestro, início do estágio de secreção e estágio final de secreção. Ao analisar os dados desses autores, considerando um modelo que contempla os efeitos grupos comparativos e fases de secreção, verificam-se resultados semelhantes e totalmente concordantes aos observados neste trabalho. Os animais controle (normais) exibem níveis de progesterona significativamente ($P < 0,01$) superiores ($20,59 \pm 3,07$ ng/ml, com $N=4$) quando comparados aos animais acometidos por HCE ($7,11 \pm 2,32$ ng/ml, com $N=7$), particularmente na fase de início do estágio de secreção. Nas fases de anestro e final do estágio de secreção, também similarmente ao que foi observado nessa pesquisa, não foram detectadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre animais normais e os animais com HCE.

As concentrações de progesterona em animais com piometra foram menores quando comparados com os animais considerados saudáveis, na fase

do diestro do ciclo estral ($10,55 \pm 2,61$ ng/mL X $24,79 \pm 3,84$ ng/mL). Esses resultados são no mínimo surpreendentes, uma vez que sendo a piometra uma doença característica da fase do diestro (JOHNSTON et al., 2001, FELDMAN e NELSON 2004; SMITH, 2006), seria esperado que os níveis de progesterona fossem iguais ou até mesmo superiores aos animais não portadores dessa enfermidade. Hagman et al. (2006) estudaram os níveis 15-Keto-13,14-dihidro-prostaglandina, um metabólito da prostaglandina, em animais saudáveis e com piometra, e verificaram que as concentrações desse metabólito foram maiores em animais com piometra, o que pode sugerir um metabolismo ou lise do corpo lúteo mais rápido em fêmeas com piometra, explicando, portanto, nossos resultados.

Ainda nesse contexto, porém considerando o modelo ruminante, a liberação de $\text{PGF2}\alpha$ em animais acometidos com piometra seria prejudicada, pois sua secreção e ou liberação pelas células do endométrio não ocorreria de maneira normal, estando comprometida pelo processo inflamatório do endométrio e pela presença de secreção uterina aumentada. Nesse caso, a secreção uterina aumentada provocaria uma inibição na liberação de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio e uma longevidade maior do corpo lúteo, com conseqüente produção de progesterona e diestro. Nossos resultados, entretanto, não confirmam essa hipótese, ao contrário, as concentrações de progesterona nas cadelas foram inferiores em animais com HCE/piometra. Talvez nas cadelas a HCE e a infecção bacteriana, seja responsável pela secreção de $\text{PGF2}\alpha$, visto pelos níveis 15-Keto-13,14-dihidro-prostaglandina aumentados, observados por Hagman et al. (2006) e conseqüente concentrações menores de progesterona.

Outra possibilidade para explicar as concentrações inferiores de progesterona em fêmeas com piometra, é se considerar a fase de diestro nesses animais mais curta, quando comparada com a duração do diestro em cadelas não acometidas. Da mesma forma, teríamos que considerar a liberação de um fator luteolítico liberado mais precocemente e influenciando a secreção de progesterona.

Entretanto, De Bosschere et al. (2001) reportaram que animais com sinais clínicos de piometra e que tomaram contraceptivos (grupo tratado) e os animais considerados clinicamente saudáveis (normais), não apresentaram diferenças

significativas ($P > 0,05$) nos níveis de progesterona sérica, achados esses, que discordam dos observados neste trabalho. Nesse caso, os resultados talvez não apresentaram diferenças significativas, devido à administração exógena de hormônio, no grupo de animais tratados. Em nosso trabalho as cadelas com diagnóstico de piometra não receberam administração de contraceptivos.

Quando se avalia apenas os animais do grupo controle (normais), os resultados observados nesse trabalho são semelhantes aos reportados por Tani et al, (1997) e Hatoya et al. (2003), os quais mostraram que os níveis de progesterona na fase de diestro são significativamente maiores ($P < 0,01$) que nas demais fases (início, meio e fim de anestro, pro-estro e estro). Esses resultados são consistentes com a literatura e com os conceitos clínicos atuais, onde a fase secretória do ciclo estral em cadelas – fase do diestro é a fase de domínio progestacional.

Os resultados citológicos encontrados neste trabalho foram classificados de acordo com Nelson e Feldman (2004). Quando confrontados com os níveis de progesterona, demonstraram que em conjunto, apresentam uma boa concordância na determinação das fases do ciclo estral o que vai ao encontro dos achados descritos na literatura (JOCHL e ANDERSEN, 1977; ARORA et al., 2006).

A classificação das fases do ciclo estral tem sido realizada com base em diferentes exames e critérios. Cock et al. (1997) classificaram animais normais e em animais com HCE utilizando os níveis de progesterona, estradiol e testosterona. Já Vermeirsch et al. (1999) descreveram a classificação das fases do ciclo estral em cadelas saudáveis por meio da dosagem de progesterona, estrógeno e testosterona, bem como o exame histológico dos ovários e útero. De Bosschere et al. (2001) classificaram as diferentes fases do ciclo utilizando somente as dosagens de progesterona e estrógeno. Jochl e Andersen (1977) relataram que os sinais clínicos apresentados pelos animais, também são dados importantes para a classificação do ciclo reprodutivo. Arora et al. (2006) classificaram as fases do ciclo estral de animais saudáveis e com piometra com base na citologia vaginal e na dosagem de progesterona plasmática, métodos estes também utilizados no presente trabalho.

Nos animais acometidos pela piometra somente duas fases distintas do ciclo estral foram evidenciadas. Em ambas as fases, no esfregaço vaginal,

foram encontradas células do epitélio vaginal, principalmente células parabasais e intermediárias, presença de polimorfonucleares e bactérias, como descrito também por Vannucchi et al. (1997) e Nelson e Feldman (2004).

De acordo com Hehm et al. (2007) para a determinação das fases do ciclo estral, a observação clínica, os níveis hormonais e esfregaços vaginais devem ser levados em consideração. A avaliação microscópica da aparência dos tecidos reprodutivos e glândula mamária quando realizadas, devem ser considerados como uma única entidade.

Concordamos com os diversos autores citados sobre os métodos e critérios estabelecidos para a determinação das fases de ciclo estral em cadelas. Infelizmente o comportamento, uma importante ferramenta para a identificação, principalmente da fase do pro-estro e estro, não foi utilizada nessa pesquisa, pois, a maioria dos animais pertencia a um programa de controle populacional, sendo impossível à obtenção de tais características.

Os achados na histologia uterina de animais saudáveis estão de acordo com a classificação observada por outros pesquisadores (JOCHL e ANDERSEN, 1977; BANKS, 1992; COCK et al., 1996; VERMEIRSCH et al., 1999; De BOSSCHERE et al., 2001). Nos animais com piometra, os exames histopatológicos do útero não apresentaram diferenças em relação aos observados por Cock et al., (1997), Vermeirsch et al., (1999), De Bosschere et al., (2001) e Arora et al., (2006), os quais também trabalharam com animais normais e com HEC/piometra.

Nosso interesse na avaliação histopatológica do útero era a determinação da presença ou não da HCE, para confirmar ou não uma alteração inicial do endométrio, como doença base para o estabelecimento da piometra. Era importante também, caracterizar a formação dos grupos o que se confirmou com os resultados obtidos, ou seja, a despeito da variação de idade, apenas 6,6% do útero dos animais controles, apresentaram HCE classificadas como de grau discreto.

Atualmente os pesquisadores vêm estudando a avaliação da expressão gênica de receptores hormonais em diferentes tecidos como, por exemplo, no hipotálamo, hipófise e ovário, e relacionando seus achados com os níveis séricos de estrógeno e progesterona. Entretanto, nenhum estudo quantificando expressão gênica de receptores de estrógeno (ER- α , ER- β) e de progesterona

(RP) em útero de cadelas normais e acometidos com piometra foi encontrado na bibliografia consultada.

Os receptores de estrógenos (ERs) são membros de uma família de receptores nucleares de moduladores de transcrição. Esses receptores agem por interação com seqüências regulatórias de DNA que se ligam a classes específicas de receptores nucleares, bem como com moléculas co-ativadoras e co-repressoras para regular a atividade do complexo RNA polimerase. Outros exemplos de receptores nucleares incluem receptores de progesterona, andrógenos, vitaminas, ou receptores órfãos, sem ligação aparente (HEWITT e KORACH, 2003).

Ainda de acordo com Hewitt e Korach (2003) dois receptores estrogênicos estão presentes nos tecidos de camundongo, os receptores α e β e cada um desses receptores exibe um padrão de expressão diferente. O ER α é encontrado em todos os tecidos reprodutivos e é o mais abundante; o ER β é produto de um gene diferente e apresenta pouca similaridade com a molécula de ER α . Tanto ER α como ER β se ligam ao estradiol e interagem com uma seqüência de DNA.

A utilização da técnica de RT-PCR permite a obtenção das taxas de transcrições de determinado gene alvo em relação a um gene referência (ou constitutivo), o que possibilita a utilização de análises quantitativas expressas em relação a um tecido ou amostra controle. Neste estudo foi utilizado como gene referência a proteína ribossomal S5 (RPS5). Tany et al. (1997) trabalharam com mRNA de α -tubulina, Inaba et al. (2002) com mRNA de β -actina e Hatoya et al. (2003) utilizaram o mRNA da subunidade ribossomal 18S. Essas diferenças na utilização dos genes referências não exibem maiores problemas na interpretação dos resultados obtidos nos diferentes experimentos. Entretanto, nos trabalhos desses autores, verifica-se ausência de informações sobre que amostra ou que fase do ciclo estral foi utilizada como controle. Este fato pode levar diferenças na quantificação das taxas de transcrição observadas nesse trabalho em relação aos reportados por Tany et al. (1997), Inaba et al. (2002) e Hatoya et al. (2003).

Neste trabalho, os níveis de mRNA dos ER- α no útero de cadelas do grupo controle (normais) não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$)

quanto as fases do ciclo estral. Estes resultados contrariam as observações, tanto de Tani et al. (1997), que avaliaram no tecido hipotalâmico de animais normais, como as de Hatoya et al. (2003), que trabalharam com amostras de tecidos do hipotálamo, hipófise e ovários de cadelas normais em diferentes fases do ciclo reprodutivo, os quais reportaram a existência de diferenças significativas ($P < 0,01$) para as taxas de transcrição dos ER- α .

A despeito da ausência de trabalhos correlatos, os resultados obtidos contrariam as expectativas de evidenciar valores superiores de mRNA dos ER α na fase de pro-estro, uma vez que as concentrações de estradiol nessa fase são superiores aos demais estágios, chegando a atingir valores da ordem de 70 pg/mL (REHM et al. 2007). Apesar da análise estatística não constatar diferença significativa entre as fases do ciclo estral, o pro-estro apresentou um valor 1,45 vezes maior ($0,66 \pm 0,49$) quando comparado com o anestro ($0,11 \pm 0,49$). Infelizmente as concentrações de estradiol realizadas não foram consistentes, impedindo observações mais detalhadas.

Para os níveis de mRNA dos ER- β em útero de cadelas normais verificou-se, no presente trabalho, a ocorrência de diferenças significativas ($P < 0,01$) das fases de anestro, pro-estro e estro para o diestro. Nas fases de anestro, pro-estro e estro não foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Hatoya et al. (2003), em ovários de cadelas normais nas diferentes fases do ciclo reprodutivo, porém para o ER- α . Entretanto, para ER- β Hatoya et al. (2003) reportaram a ocorrência de diferenças significativas ($P < 0,01$), com a fase de pro-estro apresentando maiores taxas de transcrição para ER- β , em relação às demais fases, nos tecidos do hipotálamo e hipófise. Já no tecido ovariano, Hatoya et al. (2003) reportaram maiores taxas de expressão gênica de ER- β nas fases de final de anestro, pro-estro e estro, as quais não diferiram entre si.

A concentração de mRNA dos ER- β na fase de diestro foi muito alta quando comparada aos valores das outras fases do ciclo estral. Em se considerando que os níveis de progesterona são normalmente altos nessa fase, poderíamos hipotetizar que esses animais talvez estivessem na fase final do diestro, onde a progesterona já se apresenta em declínio.

Chama a atenção, as diferenças entre os valores de ER- β nos animais controle, na fase de diestro e os animais com piometra ($16,23 \pm 2,66$ versus $1,06 \pm 1,82$). Talvez as modificações histológicas características da HCE tenham alguma influência na diminuição da concentração desses receptores, com diminuição da taxa metabólica (COCK et al. 1997). Novamente, seriam essenciais as concentrações de estradiol desses animais para considerações mais consistentes.

Neste trabalho, os níveis de mRNA dos PR no útero de cadelas, tanto no grupo controle (normais), como no grupo experimental (com piometra), não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) quanto as fases do ciclo estral avaliadas. Nenhuma literatura consultada apresenta resultados de expressão gênica de PR em útero de cadelas, sendo encontrado apenas o trabalho de Leeuwen et al. (2000), os quais clonaram e localizaram o receptor de progesterona canino em glândulas mamárias, observando baixa expressão do gene PR em tecido tumorais, quando comparados aos tecidos normais.

Para a padronização da técnica de imunistoquímica foram utilizados diferentes clones, tanto para os receptores de estrógeno, como de progesterona, a fim de se obter marcações positivas que auxiliassem no entendimento da etiologia da piometra.

Neste estudo observou-se imunoreatividade apenas para receptor de estrógeno, utilizando o clone PPG5/10 (Dako/M7292), o que vai de encontro com a literatura consultada. Cock et al. (1997), Vermeirsch et al. (2000), Dhalwal et al. (2002) e De Bosschere et al. (2002), relataram sucesso com clone 1D5 (Dako), onde foram observadas imunoreatividade em tecido uterino de cadela, porém, esses autores não apresentaram fotodocumentação, a exceção do trabalho de Dhalwal et al. (2002). Neste trabalho, o clone 1D5 foi inespecífico e marcações positivas satisfatórias para o receptor de estrógeno somente foram obtidas com a utilização do clone PPG5/10 (Dako/M7292). Brito et al. (2006), entretanto, demonstraram resultados extremamente satisfatórios na utilização de clone para estrógeno 1D5 para a marcação de imunoreatividade em tecido vaginal de cadelas normais, mas não demonstraram expressão do ER- α para animais portadores de TVT.

Dhalwal et al. (2002) estudando o efeito da escarificação endometrial sobre receptores de estrógeno e progesterona, mudanças na estrutura

histológica e flora uterina, trabalharam com o clone 16 (Nococstra/NCL-L-PGR 312). Foram reportados maiores escores de marcação para os receptores de progesterona, resultado este, diferente do encontrado neste trabalho, onde este clone não respondeu imunoreativamente.

Pesquisadores como Cock et al. (1997) e De Bosschere et al. (2002) vem trabalhando com a expressão de receptores de estrógeno em útero de cadelas com complexo hiperplasia endometrial cística e normais. Cock et al. (1997) observaram que, animais do grupo com HEC apresentaram escores significativamente ($P < 0,05$) maiores de marcação no epitélio superficial e glandular na fase final de diestro, quando comparados com animais normais na mesma fase. Ainda identificou um escore mais pronunciado para receptores estrogênicos em glândulas endometriais de cadelas tratadas com progestágenos.

Ainda segundo Cock et al. (1997) na fase de anestro, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) apenas no epitélio glandular em animais com HCE em relação aos normais. Para os demais tecidos avaliados (estroma e miométrio), não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os animais normais e com HCE. Os autores concluíram que a expressão de receptores de estrógenos foram superiores em cadelas com HCE. Os achados de Cock et al. (1997) foram semelhantes aos obtidos neste trabalho para a fase de diestro em alguns tecidos avaliados, o que pode ter ocorrido em virtude desses autores terem feito uso da avaliação da imunoreatividade utilizando escores em vez da quantificação das células imunopositivas para o receptor de estrógeno.

Na avaliação desses resultados e tomando-se como base as concentrações hormonais que identificam essas fases - diestro e anestro - podemos considerar que durante a fase secretória do ciclo estral, as concentrações de progesterona estão altas, principalmente no início, com níveis aproximados de 20ng/mL. Já as concentrações de estradiol aumentam novamente no início do diestro, ao redor do 9º dia da onda de LH e permanecem elevados por toda a fase luteal do ciclo estral, 21 a 42pg/mL; o tecido ovariano incluindo o corpo lúteo é sugerido como fonte de estradiol que juntamente com o LH e a Prolactina, podem fazer parte do complexo luteotrófico na cadela (REHM, et al., 2007).

Nossos resultados iniciais determinaram concentrações mais baixas de progesterona em animais com piometra e uma expressão de receptores de estrógenos superiores em animais acometidos por HCE. Essas observações podem ter uma importante implicação na patogênese da piometra, como resultado de um aumento significativo da expressão de receptor de estrógeno, o endométrio permanece receptivo para os estrógenos circulantes. Isso pode propiciar uma proliferação contínua das glândulas endometriais, durante uma fase do ciclo quando há uma forte influência da progesterona, induzindo a secreção glandular.

De Bosschere et al. (2002), trabalharam com tecidos uterinos categorizados em: tecido normal, com HCE-mucometra e com endometrite-piometra nas fases de anestro e diestro. Observaram que o epitélio superficial e glandular, bem como, estroma e miométrio, não diferiram significativamente ($P > 0,05$) entre tecidos uterinos normais e com HCE-mucometra. Entretanto, esses autores relataram a existência de resultados significativos ($P < 0,05$), com os escores médios de marcação dos tecidos uterinos normais e com HCE-mucometra superiores quando comparados aos escores de marcação dos tecidos uterinos com endometrite-piometra. Esses achados de De Bosschere et al. (2002), são totalmente contrários aos observados neste trabalho, os quais, por meio de técnica de quantificação dos receptores nas várias camadas uterinas, observou que em ambas as fases do ciclo estral, anestro e diestro, as porcentagens de células imunopositivas para o receptor de estrógeno avaliado, foram significativamente ($P < 0,01$) superiores em animais do grupo experimental (com piometra) quando confrontados com os animais do grupo controle (normais) e ainda, para todas as camadas uterinas avaliadas.

Considerando nossos resultados e os achados de Cock et al. (1997), o aumento da expressão dos receptores de estrógeno em cadelas acometidas de HCE/piometra, a despeito da presença e severidade de infecção, suporta a hipótese de que as bactérias não são as causas primárias da piometra.

Estudando escores de marcação para receptores de estrógeno nas diferentes fases do ciclo reprodutivo de animais normais, Vermeirsch et al. (1999) reportam intensidades de marcação maiores nos cornos uterinos durante a fase de pro-estro, com diminuição durante a fase de estro e início de diestro, aumentado na fase de final de diestro. Durante a fase de anestro foram

observados escores altos para esses receptores, indicando uma sensibilidade estrogênica no estágio de quiescência sexual. Vermeirsch et al. (1999), relataram ainda, correlações negativas entre os escores de marcação no útero e os níveis séricos de progesterona. Neste trabalho, também foi verificada correlação negativa (-0,1236) entre o escore de marcação e os níveis séricos de progesterona, porém tal correlação pode ser considerada nula, por estar muito próximo a zero.

Com base nos resultados deste trabalho e em metanálise para os níveis de estradiol sérico reportados por Cock et al. (1997), observou-se que o grupo experimental apresentou níveis maiores de estradiol no final do anestro em relação aos animais do grupo controle. Este fato sugere que tal hormônio seja o responsável pela antecipação do processo de transcrição nos animais do grupo experimental. Estas evidências poderiam explicar os baixos níveis de expressão gênica dos ERs, principalmente ER- β nas fases avaliadas no grupo experimental, bem como, altas porcentagens de células marcadas e maiores escores de marcação por meio de imunistoquímica para os mesmos receptores. Contudo, para que esta hipótese seja confirmada faz-se necessária a dosagem de estradiol dos animais deste trabalho.

A etiologia exata da HCE ainda não é totalmente conhecida nas cadelas; os hormônios esteróides e seus receptores apresentam uma importante relação com as alterações histológicas visíveis no endométrio, durante o ciclo estral. Embora modificações nos receptores de estrógenos e progesterona tenham sido descritos no útero de cadelas com HCE, provavelmente não são os únicos fatores envolvidos. É claro que mais pesquisas são necessárias antes que conclusões possam ser feitas; a determinação de concentrações e ligações com fatores de crescimento em cães normais e com piometra são particularmente importantes, desde que, existam relações entre esses fatores e a expressão de receptores de ER e PR descritas na literatura.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- (i) Os níveis de progesterona sérica em animais acometidos com piometra são baixos, quando comparados com animais normais em diestro. Os animais sem comprometimento uterino apresentam perfil sérico de progesterona compatível com os descritos na literatura: níveis basais na fase de pro-estro, em elevação no estro, concentrações máximas no diestro e novamente níveis basais no anestro.
- (ii) Os exames histopatológicos sugerem que a piometra é precedida da HEC.
- (iii) As expressões gênicas de receptores ER- α são semelhantes em animais em atividade cíclica e com piometra.
- (iv) As expressões gênicas de receptores ER- β apresentam maiores taxas de transcrição em animais saudáveis, em diestro.
- (v) As expressões gênicas de receptores PR são semelhantes em animais em atividade cíclica e com piometra.
- (vi) As porcentagens de células imunopositivas para o receptor de estrógeno, obtido pela técnica de imunistoquímica, são superiores nos animais com piometra para todas as camadas de tecido uterino avaliados.
- (vii) As informações relacionadas às dosagens de estradiol sérico, bem como, as porcentagens de células imunopositivas e os escores de marcação para o receptor de progesterona entre os grupos comparativos, são de fundamental importância para o melhor entendimento da etiologia da piometra.

8. BIBLIOGRAFIA

ARORA, N.; SANDFORD, J.; BROWNING, G.F. SANDY, J.R. WRIGHT, P.J. A model for cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1530-1536, 2006.

BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**, São Paulo: Roca, 1992. 629p.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação Agrícola**. Jaboticabal/SP: FUNEP, 2006. 237p.

BIANCHI, C. P; MEIKLE, A.; SARTORE, I.; GONZÁLEZ, F.; ABA, M.A. Uterine estrogen receptor alpha and progesterone receptor during the follicular and luteal phase in Llamas. **Animal Reproduction Science**, v. 74, n. 8, p. 1043-1052, 2006.

BIRCHARD, J.S.; SHERDING, G.R. **Clínica de pequenos animais, Manual Saunders**, São Paulo: Roca, 1998. 1782p.

BIGLIARDI, E.; PARMIGIANI, E.; CAVIRANI, S.; LUPI, A.; L.; CORRADI, A. Ultrasonography and Cystic Hyperplasia-Pyometra Complex in the Bitch. **Reproduction Domestic Animals**, v. 39, n. 3, p.136-140, 2004.

BREITKOPF, M.; HOFFMANN, B.; BOSTEDT, H. Treatment of pyometra (cystic endometrial hyperplasia) in bitches with an progestin. **Journal Reproduction and Fertility** v. 51, Suppl., p. 327-331, 1997.

BRITO, C.P.; OLIVEIRA, C.M; SOARES, F.A.; FAUSTINI,M.; OLIVEIRA, C.A. Immunohistochemical determinaton of estrogen receptor- α in vaginal and tumor tissues of healthy and TVT-affected bitches and their relation to serum concentrations of estradiol-17 beta and progesterone. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1587-1592, 2006.

CORRADA, Y.; ARIAS, A.; RODRIGUEZ, R.; TORTORA, M.; GOBELLO, C. Combination dopamine agonist and prostaglandin agonist treatment of cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1557-1559, 2006.

DHALIWAL, G.K.; ENGLAND, G. C. W.; NOAKES, D.E. The effects of endometrial scarification on the uterine steroid receptor, bacterial flora and histological structure in the bitch. **Animal Reproduction Science**, v. 69, n. 3-4, p. 239-249, 2002.

DE COCK, H.; VERMEIRSCH, H.; DUCATELLE H.; DE SCHEPPER J. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cyst-endometritis-pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 1035-1047, 1997.

CHEN, Y.M.M.; LEE, C.S.; WRIGHT, P.J. The roles of progestagen and uterine irritant in the maintenance of cystic endometrial hyperplasia in the canine uterus. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1537-1544, 2006.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE H.; VERMEIRSCH, H.; VAN DEN BROECK, W; CORYN, M. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? **Theriogenology**, v. 55, n.7, p. 1509 -1519, 2001.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE H.; VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P, W.; CORYN, M. Estrogen- α and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. **Animal Reproduction Science**, v. 70, n. 3-4, p. 251-259, 2002.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, H.; TSHAMALA, M. Uterine oestrogen and progesterone receptor expression in experimental pyometra in the bitch. **Journal Compediun Pathology**, v. 128, n. 2-3, p. 99 - 106, 2003.

ENGLAND, G. C.; FREEMAN, S.L.; RUSSO, M. Treatment of spontaneous pyometra in 22 bitches with a combination of cabergoline and cloprostenol. **Veterinary Record**, v. 160, n. 9, p. 293 – 296, 2007.

ETTINGER, J.S. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1997.2156 p.

FALDYMA, M.; LAZNICKA, A.; TOMAN, M. Immunosuppression in the bitches with pyometra. **Journal of Small Animal Practice**, v. 45, n. 1, p. 5 -10, 2001.

FANTONI, D. T.; AULER, J. O. C.; FUTEMA, F.; CORTOPASSI, S. R. G.; MIGLIATI, E R.; FAUSTINO, M.; OLIVEIRA, C. M. Intravenous administration of hypertonic sodium chloride solution with dextran or isotonic sodium chloride solution for treatment of septic shock secondary to pyometra in dogs. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 215, n. 9, p.1283-1287, 1999.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine e feline endocrinology and reproduction**, 2 ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004, 785 p.

FERREIRA, C. R.; LOPES, M.D. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano V, n.27, p.36-42, 2000.

FIENE, F. Clinical evaluation of the use of aglepristone, with or without cloprostenol, to treat cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in bitches. **Theriogenology**, v. 66, p. 1550-1556, 2006.

FRANSSON, B. A; RAGLE, C.A. Canine Pyometra: An Update on Pathogenesis and Treatment. **Compendium**, Washington, v. 25, n. 8, p. 602-612, 2003.

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**, São Paulo: Roca, 2001. 1335p.

GILBERT, R.O. Diagnosis and Treatment of pyometra in bitches and queens. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.14, n. 6, p. 777-784, 1992.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 7ª edição, São Paulo: Manole, 2002. 513 p.

HAGMAN, R.; KINDAHL, H.; FRANSSON, B.A.; BERGSTROM, A.; HOLST, B.S.; LAGERSTEDT, A.S. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia-pyometra in the bitches by prostaglandin F_{2α} metabolite analysis. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 198-206, 2006.

HATOYA, S.; TORII, R.; KUMAGAYA, D. et al. Expression of estrogen receptor α and β genes in the mediobasal hypothalamus, pituitary and ovary during the canine estrous cycle. **Neuroscience Letters**, v. 347, n. 2, p. 131-135, 2003.

HERNANDEZ J.L.; BESSO J.G.; RAULT D.N.; COHEN A.H.; GUIONNET A.; BEGON D.; RUEL Y. Emphysematous pyometra in a dog. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 44, n.2, p.196-8, 2003.

HEWITT, S.C. & KORACH, S. K. Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors α and β in reproductive tissues. **Reproduction and Fertility**, v. 125, n. 2, p. 143-149, 2003.

JOCHL, W; ANDERSEN, A.C. The estrous in the dog: A review. **Theriogenology**, v.7, n. 3, p.113-140, 1977.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V.R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline Theriogenology**, Philadelphia: WB Saunders Company, 2001. 592p.

KIDA, K; BABA, E; TORRI, R; KAWATE, N; HATOYA, S; WIJEWARDANA, V.; SUGIRA, K.; SAWADA, T.; TAMADA, H.; INABA, T. Lactoferrina expression in the canine uterus during the estrous cycle and with pyometra. **Theriogenology**, v. 66, p.1325-1333, 2006.

LEEUEWEN, I.S.L.; GARDEREN, E.; RUTTEMAN, G.R.; MOL, J.A. Cloning and localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. **The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 75, p. 219-228, 2000.

LOPES, M.D.; BICUDO S.D. Terapêutica do Sistema Reprodutor, In: **MANUAL DE TERAPÊUTICA VETERINÁRIA**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2002.p.309-331.

NELSON L. W.; KELLY W.A. Progesterone related gross and microscopic changes in female beagles. **Veterinary Pathology**. v. 13, p. 143-156, 1976.

NOAKES, D. E.; PARKINSON, T. J.; ENGLAND, G. C. W. **Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics**., 8 ed. Toronto: WB Saunders Company, 2001.868p.

PEREZ, R. R.; OLIVEIRA, P. C.; SOUZA, M.C.I.; LOPES, P. R. Estudo comparativo de parâmetros hematológicos em cadela com cervix aberta e fechada. **CD rom**, Gramado, Combravet, 2002.

PFFAFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**. v.1-29 (9), p.e45, 2001.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62-66, 2003.

RASMUSSEN R. Quantification on the Light Cycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, editors. Rapid cycle real time PCR, methods and applications. Heidelberg: Springer Press; 2001. p.21–34.

REHM, S.; STANISLAUS, J.; WILLIAMS, A.M. estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. **Birth Defects Research (Part B)**, v. 80, p.233-245, 2007.

SANDHOLM, M; VASENIUS, H; KIVISTO A. K. Pathogenesis of canine pyometra. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.1, n. 11, p. 1006 -10, 1975.

SAS. **USER'S GUIDE: basic and statistic**. Cary: SAS, 1995. 1986 p.

SMITH, F.O. Canine pyometra. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 610-612, 2006.

TANI H.; INABA, T.; MATSUMAAMA, S.; TAKAMORI, Y.; TORII, R.; TAKANO, H.; TAMADA, H.; SAWADA, T. Enhancement of estrogen receptor gene expression in the mediobasal hypothalamus during anestrus in the beagle bitch. **Neuroscience Letters**., v. 227, n. 3, p. 149-152, 1997.

TRASCH, K.; WEHREND, A.; BOSTEDT, H. Follow-up examinations of the bitches after conservative treatment of pyometra with the antigestagen aglepristone. **Journal Veterinary Medicine Animal Physiology and Pathology Clinic Medical**, v. 50, n. 7, p.375-379, 2003.

TOSHIO, I.; NAMURA, T.; TANI, H. et al. Enhancement of aromatase gene expression in the mediobasal hypothalamus during anestrus in the beagle bitch. **Neuroscience Letters**, v. 333, n. 2, p. 107-110, 2002.

VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; LAUWERS, H.; CORYN, M. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to the sex hormone levels. **Theriogenology**, v. 51, n. 4, p. 729 -743, 1999.

VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; LAUWERS, H. Immunohistochemical detection of the estrogen receptor- α and progesterone receptor in the canine pregnant uterus and placental labyrinth. **The Anatomical Record**, v. 260, p. 42-50, 2000.

VERMEIRSCH, H.; BROECK, W. V.; CORYN, M.; SIMOENS, P. Immunohistochemical detection of androgen receptors in the canine uterus throughout the estrus cycle. **Theriogenology**, v. 57, n. 2, p. 2203-2216, 2002.

VERSTAGEN, J.; VERSTAGEN-ONCLIN, K. Pyometra in the bitch and queen. **Proceedings: 2006 NAVC Conference Proceedings: Small Animal and Exotics Section**. Ed. Publisher: NAVC: Orlando, Florida, v. 20, p. 1277-1278, 2006.

WADAS, B.; LAGERSTEDT, A.; JONSSON, P. Biochemical phenotypes of *Escherichia coli* in dogs: comparison of isolates from bitches suffering from pyometra and urinary tract infection with isolates from healthy dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 52, n. 3-4, p. 293-300, 1996.

WANKE, M. M.; GOBELLO, C. **Reproduccion en Caninos y Felinos Domesticos**. Buenos Aires: Inter.-Medica, 2006. 308 p.

ZARAGOSA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; MAÑE, M.C. Canine pyometra: a study of urinary proteins by SDS-PAGE and Western blot. **Theriogenology**, v.61, n. 7-8, p.1259-72, 2004.