

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOISTOQUÍMICA DO ÚTERO E
CÉRVIX DE CADELAS COM O DIAGNÓSTICO DE PIOMETRA

RODRIGO VOLPATO

Botucatu-SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOISTOQUÍMICA DO ÚTERO E
CÉRVIX DE CADELAS COM O DIAGNÓSTICO DE PIOMETRA

RODRIGO VOLPATO

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Botucatu, para obtenção do título de Mestre na área de Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^a. Tit. Maria Denise Lopes

Nome do autor: Rodrigo Volpato

Título: Avaliação clínica e imunoistoquímica do útero e cérvix de cadelas com diagnóstico de piometra

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Titular Maria Denise Lopes

Presidente e orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Adj. Nereu Carlos Prestes

Membro da banca examinadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Assist. Daniel Bartoli de Sousa

Membro da banca examinadora

Departamento: Laboratório de Reprodução Animal

Centro Universitário de Rio Preto - UNIRP

Data da Defesa: 30 de junho de 2011

Dedicatória

DEDICATÓRIA

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

Aos meus pais, *Antônio Carlos e Roselene*, por todo apoio em todos os momentos. Por acreditarem e confiarem em meus ideais, por patrocinarem meus sonhos, pela inesgotável fonte de estímulo para meu aprimoramento, sem o qual talvez este trabalho não pudesse ter sido finalizado.

Aos meus irmãos, *Andressa e Gustavo*, pelo respeito e orgulho compartilhados, por dividirem comigo minhas vitórias e minhas derrotas.

Ao meu melhor amigo, companheiro, porque não dizer irmão ou filho. Ao meu cachorro *Jim*. Acompanhou-me por cinco anos de graduação, por um 2006 de lutas, estudos e frustrações, por dois anos de residência e por fim o mestrado. Esse "cara" me acompanha por mais de dez anos migrando por todas as cidades durante a minha jornada de aprendizado. Quando estou triste, ele está triste; quando estou feliz, ele está feliz. Nos entendemos com uma troca de olhares, sem palavras. Amor incondicional.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Chega ao fim uma etapa muito importante da minha vida. Para chegar até aqui contei com o apoio de muitas pessoas que acreditaram em mim, me ensinaram não só informações importantes para realizar este trabalho, mas também, formas novas de encarar o mundo e superar obstáculos que irei enfrentar no futuro. Para todas essas pessoas, muito obrigado!

Agradeço imensamente minha orientadora **Profa Titular Maria Denise Lopes** pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela amizade, dedicação, conhecimentos compartilhados e principalmente por acreditar no meu trabalho

Ao **Prof. Dr. Daniel Bartoli de Sousa**, pela orientação na residência, idéia do mestrado, amizade e dedicação.

A **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu por minha formação acadêmica, ao **Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária** e a **Seção de Pós-graduação** pela oportunidade concedida.

Aos docentes do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, **Nereu Carlos Prestes, Sony Dimas Bicudo, João Carlos Pinheiro Ferreira, Frederico Ozanam Papa, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Marco Antônio Alvarenga, Cezinande Meira** e, em especial, a **Eunice Oba**, pela ajuda com as dosagens hormonais.

Ao **Ian Martin** por me auxiliar inúmeras vezes com a imunoistoquímica. A **Profa. Dra. Renée Laufer Amorim** por me receber em seu laboratório de forma tão amigável.

A **Aline**, pelo empenho durante sua residência em ajudar meu projeto, pelo convívio, amizade sincera, exemplo e modelo de princípios invejáveis, educação, humildade, dedicação, profissionalismo, dentre outras inúmeras qualidades. Muito obrigado pequeno talismã!!!

Aos amigos de república e agregados, pelos churrascos, conversas, risadas, e porque não dizer troca de conhecimentos e ajudas mútuas. **Duvéio, Marcel, Alemão e Rodolfo** muito obrigado pelos momentos de descontração.

Aos amigos do REPAS, **Renatinha, Camila, Guta, Bethânia, Luis, Ana Isabel, Moisés, Vivi, Carlos Renato e Leda** pelo convívio diário, oportunidades de trabalhos, momentos de estudos e de descontração.

Ao **Sérgio**, amigo e veterinário da Arca de Noé, pelas trocas de experiências, oportunidades concedidas e principalmente por acreditar e confiar no meu trabalho.

Aos velhos amigos de Itu, amigos de anos e décadas, **Cristovão, Marquinho, Torto, Ferdi, Bel, Júlio, Na e Milinha**. Mesmo ficando anos sem nos falarmos, quando nos reunimos, parecem apenas dias.

A **CAPES** pela concessão de bolsa de estudo e financiar minha vivência em Botucatu.

A **Fundação para Desenvolvimento da UNESP** – FUNDUNESP pelo auxílio financeiro concedido.

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

.

*“Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto,
hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e
principalmente viver.”*

Dalai Lama

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Valores médios e desvio padrão ($x \pm s$) das variáveis do leucograma: leucócitos, bastonetes, segmentados, linfócitos, eosinófilos e monócitos para os animais dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.....32

TABELA 02: Valores médios e desvio padrão ($x \pm s$) das variáveis: hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, CHCM, proteína plasmática, RDW, plaquetas do eritrograma para os animais dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.....33

TABELA 03: Valores médios e desvio padrão ($x \pm s$) da creatinina e uréia dos animais dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.....34

TABELA 04: Valores médios e desvio padrão ($x \pm s$) das dosagens plasmáticas de progesterona (ng/mL) dos animais dos grupos de piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.....34

TABELA 05: Número das fêmeas e bactérias isoladas: *Escherichia coli* (E. coli), *Enterobacter* sp (Entero), *Streptococcus* sp (Strepto), *Alcaligenes faecalis* (Alcal), *Klebsiella pneumoniae* (Klebs), *Edwardsiella tarda* (Edward) no conteúdo uterino, vesical e culturas negativas. Botucatu, 2011.....35

TABELA 06: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) avaliando as bactérias isoladas no útero: *Escherichia coli* (E. coli), *Enterobacter* sp (Entero), *Streptococcus* sp (Strepto), *Alcaligenes faecalis* (Alcal), *Klebsiella pneumoniae* (Klebs) e *Edwardsiella tarda* (Edward). Botucatu, 2011.....36

TABELA 07: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) avaliando as bactérias isoladas na urina: *Escherichia coli* (E. coli), *Enterobacter* sp (Entero), *Streptococcus* sp (Strepto) e *Alcaligenes faecalis* (Alcal). Botucatu, 2011.....36

TABELA 08: Valores médios e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) dos núcleos considerados positivos (imunomarcados) para receptores de estrógeno α no epitélio glandular (RE α _cérv_gland), estroma (RE α _cérv_estroma) e epitélio luminal (RE α _cérv_epitel) da cérvix e epitélio glandular (RE α _útero_gland) e estroma (RE α _útero_estroma) no endométrio das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.....38

TABELA 09: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando como variável a intensidade da imunomarcção - fraco, moderado e forte para receptores de estrógeno α na região glandular do útero. Botucatu, 2011.....39

TABELA 10: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando como variável a intensidade de imunomarcção - fraco, moderado e forte para receptores de estrógeno α na região do estroma uterino. Botucatu, 2011.....39

TABELA 11: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando como variável a intensidade da imunomarcção - fraco, moderado e forte para receptores de estrógeno α na região glandular da cérvix. Botucatu, 2011.....39

TABELA 12: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando como variável a intensidade de imunomarcção - fraco, moderado e forte para receptores de estrógeno α na região do estroma cervical. Botucatu, 2011.....40

TABELA 13: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando como variável a intensidade de imunomarcações - fraco, moderado e forte para receptores de estrógeno α na região do epitélio luminal cervical. Botucatu, 2011.....40

TABELA 14: Porcentagem das imunomarcações - fraco, moderado e forte para receptores de estrógeno α nas regiões do epitélio glandular e estroma do útero de animais portadores de piometra (n= 31). Botucatu, 2011.....41

TABELA 15: Porcentagem das imunomarcações - fraco, moderado e forte, para receptores de estrógeno α nas regiões do epitélio luminal, epitélio glandular e estroma da cérvix de animais portadores de piometra (n= 31). Botucatu, 2011.....41

TABELA 16: Valores médios e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) dos núcleos positivos (imunomarcados) para receptores de estrógeno β no epitélio glandular (RE β _cérv_gland), estroma (RE β _cérv_estroma) e epitélio luminal (RE β _cérv_epitel) da cérvix e epitélio glandular (RE β _útero_gland) e estroma (RE β _útero_estroma) do útero de cadela com piometra aberta e fechada. Botucatu, 2011.....42

TABELA 17: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de estrógeno β na região glandular do útero. Botucatu, 2011.....43

TABELA 18: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de estrógeno β na região do estroma uterino. Botucatu, 2011.....43

TABELA 19: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de estrógeno β na região glandular da cérvix. Botucatu, 2011.....43

TABELA 20: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de estrógeno β na região do estroma cervical. Botucatu, 2011.....44

TABELA 21: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de estrógeno β na região do epitélio cervical. Botucatu, 2011.....44

TABELA 22: Intensidade das imunomarcações – forte, moderado e fraco para receptores de estrógeno β nas regiões do epitélio glandular e estroma do útero de cadelas portadoras de piometra (n=31). Botucatu, 2011.....45

TABELA 23: Intensidade das imunomarcações – forte, moderado e fraco para receptores de estrógeno β nas regiões do epitélio luminal, epitélio glandular e estroma da cérvix de cadelas portadoras de piometra (n=31). Botucatu, 2011.....45

TABELA 24: Valores médios e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) dos núcleos positivos (imunomarcados) para receptores de progesterona nas regiões do epitélio glandular (RP4_cérv_gland), estroma (RP4_cérv_estroma) e epitélio luminal (RP4_cérv_epitel) da cérvix e epitélio glandular (RP4_útero_gland) e estroma (RP4_útero_estroma) do útero entre os grupos piometra aberta e fechada. Botucatu, 2011.....46

TABELA 25: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de progesterona na região glandular do útero. Botucatu, 2011.....47

TABELA 26: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de progesterona na região do estroma uterino. Botucatu, 2011.....47

TABELA 27: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de progesterona na região glandular da cérvix. Botucatu, 2011.....48

TABELA 28: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de progesterona na região do estroma cervical. Botucatu, 2011.....48

TABELA 29: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de progesterona na região do epitélio cervical. Botucatu, 2011.....48

TABELA 30: Intensidade das imunomarcações – forte, moderado e fraco para receptores de progesterona nas regiões do epitélio glandular e estroma do útero. Botucatu, 2011.....49

TABELA 31: Intensidade das imunomarcações – forte, moderado e fraco para receptores de progesterona nas regiões do epitélio luminal, epitélio glandular e estroma da cérvix. Botucatu, 2011.....49

TABELA 32: Valores médios e desvio padrão ($x \pm s$) das áreas imunomarcadas para colágeno I, nas regiões glandular (Col_I_Gland_Cérvix) e muscular (Col_I_Musc_Cérvix) da cérvix e glandular (Col_I_Gland_Útero) e muscular (Col_I_Musc_Útero) do útero, entre os grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.....51

TABELA 33: Valores médios e desvio padrão ($x \pm s$) das áreas imunomarcadas para colágeno III, nas regiões glandular (Col_III_Gland_Cérvix) e muscular (Col_III_Musc_Cérvix) da cérvix, e glandular (Col_III_Gland_Útero) e muscular (Col_III_Musc_Útero) do útero, entre os grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.....52

TABELA 34: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para colágeno I na cérvix. Botucatu, 2011.....52

TABELA 35: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para colágeno I no útero. Botucatu, 2011.....53

TABELA 36: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para colágeno III na cérvix. Botucatu, 2011.....53

TABELA 37: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para colágeno III no útero. Botucatu, 2011.....53

TABELA 38: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ampicilina. Botucatu, 2011.....100

TABELA 39: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a amoxicilina associada a ácido clavulânico. Botucatu, 2011.....100

TABELA 40: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalexina. Botucatu, 2011.....101

TABELA 41: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalotina. Botucatu, 2011.....101

TABELA 42: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ceftiofur. Botucatu, 2011.....102

TABELA 43: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a doxiciclina. Botucatu, 2011.....102

TABELA 44: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a enrofloxacin. Botucatu, 2011.....103

TABELA 45: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ciprofloxacina. Botucatu, 2011.....103

TABELA 46: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a sulfa associada a trimetoprim. Botucatu, 2011.....104

TABELA 47: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ampicilina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....104

TABELA 48: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a amoxicilina associada a ácido clavulânico no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....105

TABELA 49: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalexina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....105

TABELA 50: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalotina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....106

TABELA 51: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ceftiofur no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....106

TABELA 52: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a doxiciclina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....107

TABELA 53: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a enrofloxacin no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....107

TABELA 54: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ciprofloxacina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....108

TABELA 55: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a sulfa associada a trimetopim no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....108

TABELA 56: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ampicilina na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....109

TABELA 57: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a amoxicilina associada a ácido clavulânico na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....109

TABELA 58: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalexina na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....110

TABELA 59: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalotina na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....110

TABELA 60: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ceftiofur na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....111

TABELA 61: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a doxiciclina na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....111

TABELA 62: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a enrofloxacin na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....112

TABELA 63: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ciprofloxacina na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....112

TABELA 64: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a sulfa associada a trimetopim na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.....113

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Imagens das placas utilizadas para cultura e antibiograma, sendo “A” crescimento bacteriano de uma amostra semeada em meio de ágar Mac Conkey e “B” teste de antibiograma através da medição das zonas de inibição.....37

Figura 02: Detecção imunoistoquímica, sendo considerados núcleos positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azuis. “A” receptores de progesterona no epitélio luminal da cérvix, aumento 400X; “B” receptores de progesterona no epitélio glandular e estroma da cérvix, “C” receptores de progesterona no epitélio glandular e estroma do útero, “D” receptores de estrógeno α no epitélio luminal da cérvix, “E” receptores de estrógeno α no epitélio glandular e estroma da cérvix, “F” receptores de estrógeno α no epitélio glandular e estroma do útero, “G” receptores de estrógeno β no epitélio luminal da cérvix, “H” receptores de estrógeno β no epitélio glandular e estroma da cérvix, “I” receptores de estrógeno β no epitélio glandular e estroma do útero, aumento 200X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.....50

Figura 03: Imunomarcção para colágeno I representados na coloração marrom, aumento de 200X, sendo “A” região estroma da cérvix, “B” região muscular da cérvix, “C” região glandular do útero e “D” região muscular do útero. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.....54

Figura 04: Imunomarcção para colágeno III representados na coloração marrom, aumento de 200X, sendo “A” região estroma da cérvix, “B” região muscular da cérvix, “C” região glandular do útero e “D” região muscular do útero. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.....55

SUMÁRIO

RESUMO	02
ABSTRACT.....	04
1. Introdução.....	06
2. Objetivos.....	10
2.1. Objetivo Geral.....	10
2.2. Objetivo Especifico.....	10
3. Revisão de Literatura.....	12
3.1. Fisiopatogenia.....	12
3.2. Receptores Uterinos.....	14
3.3. Agentes Etiológicos.....	16
3.4.. Sinais Clínicos.....	18
3.5. Exames Laboratoriais.....	19
4. Material e Métodos.....	23
4.1. Anamnese.....	23
4.2. Animais.....	23
4.3. Hemograma e perfil renal.....	24
4.4. Dosagem plasmática de progesterona.....	24
4.5. Ovariosalpingohisterectomia.....	25
4.6. Cultura e antibiograma.....	25
4.7. Imunoistoquímica.....	26
4.8. Estatística.....	30
5. Resultados.....	32
5.1. Eritrograma e leucograma.....	32
5.2. Função renal.....	33
5.3. Dosagem plasmática de progesterona	34
5.4. Cultura e antibiograma.....	34
5.5. Imunoistoquímica.....	37
5.5.1. Receptores de estrógeno α	37
5.5.2. Receptores de estrógeno β	42
5.5.3. Receptores de progesterona.....	46
5.5.4. Colágeno I e III.....	51

6. Discussão.....	57
7. Conclusão.....	70
8. Referências.....	72
Trabalho científico.....	80
Apêndice.....	99

Resumo

VOLPATO, R. Avaliação clínica e imunoistoquímica do útero e cérvix de cadelas com o diagnóstico de piometra. Botucatu, 2011. 113p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi analisar de forma comparativa piometra de cérvix aberta e fechada a fim de compreender o mecanismo de abertura e fechamento cervical. Para tanto, foram utilizadas 31 cadelas, de raças e idades variadas, sendo 25 cadelas com piometra de cérvix aberta e 6 de cérvix fechada. Durante a ovariossalpingohisterectomia (OSH), utilizada como tratamento, foi coletado sangue por venopunção da jugular e conteúdo vesical. Após o procedimento, foram coletados fragmentos da cérvix e do útero para a avaliação imunoistoquímica, além do conteúdo uterino. Para a avaliação imunoistoquímica foram analisados os receptores de estrógeno α e β , progesterona e colágeno I e III. Foram realizadas imunomarcações em diferentes regiões da cérvix como o epitélio glandular, epitélio luminal e estroma, assim como em diferentes regiões do útero como epitélio glandular e estroma. As imunomarcações de colágeno I e III foram realizadas nas regiões glandular e muscular da cérvix e útero. Foram realizadas análises bacterianas do conteúdo uterino e vesical e o perfil de sensibilidade das bactérias através de antibiogramas, testando os antibióticos mais comumente descritos na literatura. Foram realizados os testes estatísticos Mann-Whitney, quiquadrado e correlação Spearman do teste de Fisher e concordância Kappa, dependendo da variável trabalhada. Os receptores de estrógeno α e β , colágenos I e III comportaram-se da mesma maneira na piometra aberta e fechada. As concentrações de receptores de progesterona foram superiores nas piometras fechadas. As concentrações de progesterona plasmática foram semelhantes nas piometras abertas e fechadas. O hemograma das cadelas com piometra aberta e fechada foram semelhantes e característicos de um processo inflamatório crônico. A função renal dos animais comprometidos estão dentro dos limites considerados normais para espécie canina. Houve uma correlação positiva entre as bactérias isoladas do conteúdo uterino e vesícula urinária. A bactéria mais frequentemente isolada foi a *E. coli* e o antibiótico mais sensível foi a doxiciclina. Novos estudos são necessários para compreender o mecanismo de controle da abertura e fechamento cervical.

Palavras-chave: cadela, piometra, imunoistoquímica

Abstract

VOLPATO, R. Clinical and Immunohistochemical evaluation of the cervix and uterus of bitches diagnosed with pyometra. Botucatu, 2011. 113p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze comparatively open and closed cervix pyometra in order to understand the mechanism of cervical opening and closing. To this end, we used 31 bitches of different breeds and ages, 25 with pyometra cervix open and 6 closed cervix. During ovariohysterectomy (OSH), used as treatment, blood by venipuncture from the jugular and vesical content were collected. After the procedure, samples were collected from the cervix and uterus to evaluate immunohistochemistry, and the uterine contents. For immunohistochemical evaluation were analyzed estrogen receptors α and β , progesterone and collagen I and III. Immunostainings were performed in different regions of the cervix such as glandular epithelium, luminal epithelium and glandular stroma, as well as in different regions of the uterus as glandular epithelium and glandular stroma. The immunostainings for collagen I and III were performed in muscular and glandular regions of the cervix and uterus. We analyzed the bacterial content of the uterus and bladder and the susceptibility profile of bacteria through antibiograms, testing the antibiotics most commonly reported. Through appropriate statistical. The estrogen receptors α and β , collagen I and III behaved the same way in both open and closed pyometra. Concentrations of progesterone receptors were higher in closed pyometra. The plasma progesterone concentrations were similar in both open and closed pyometra. Hemogram bitches with pyometra opened and closed were similar and characteristic of a chronic inflammatory process. The renal function of animals affected are within the range considered normal for dogs. There was a positive correlation between bacteria isolated from urinary bladder and uterine contents. The most frequently isolated bacteria was *E. coli* and the antibiotic doxycycline was more sensitive. Further studies are needed to understand the mechanism controlling the cervical opening and closing.

Keywords: bitches, pyometra, immunohistochemistry

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Embora nos últimos anos o conhecimento a respeito da fisiologia reprodutiva dos cães tenha aumentado, muitos mecanismos responsáveis pelo controle e fisiologia reprodutiva permanecem desconhecidos. Mesmo doenças frequentes como a piometra não são completamente elucidadas, necessitando de estudos, por existir controversas entre autores quanto a sua etiologia (GOERICKE-PESCH et al., 2010).

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

A hiperplasia endometrial cística (HEC) é uma alteração endometrial de cadelas e está correlacionada com altas concentrações de estrógeno e exposição prolongada a progesterona, endógena ou exógena. É considerada um dos fatores predisponentes da hidrometra, mucometra e piometra (OLIVEIRA, 2007).

A piometra é uma enfermidade da cadela adulta caracterizada pela inflamação do útero com acúmulo de exsudato, que ocorre na fase lútea do ciclo estral, de quatro semanas a quatro meses após o estro (COGGAN et al., 2004; SMITH, 2006). No diestro ocorre uma hipertrofia/hiperplasia do endométrio estimulado pela progesterona e, subsequentemente, uma invasão bacteriana (WEISS et al., 2004). Trata-se de uma das enfermidades mais comuns que ocorre no trato genital das fêmeas caninas (COGGAN et al., 2004; PRETZER, 2008).

É conhecido que algumas raças como Rottweiler, Collie, Golden Retriever, Labrador Retriever e Pastor Alemão têm uma maior incidência de piometra. Segundo Hagman et al (2011), os fatores de risco para a doença podem variar entre as raças e a gestação sendo considerada um fator protetor contra a piometra, com exceção da raça Golden Retriever onde a nuliparidade pode não ter interferência. De 87 cães com piometra, 24 eram da raça Golden Retriever e 22 já haviam apresentado pelo menos uma gestação.

A patogênese da piometra canina não é completamente esclarecida, a despeito de décadas de estudo sobre a etiologia desta doença. O conceito de Síndrome Hiperplasia

Endometrial Cística/Piometra introduzido por Dow (1957; 1958), sugere que mudanças hormonais provocam a HEC e tornam o útero mais susceptível a infecção secundária. Dow (1958) e Sandholm et al (1975) propuseram que uma endometrite sub-aguda é seguida pela HEC, a qual predispõe a piometra. De Bossechere et al (2001) sugeriram que devido as diferenças clínicas e histopatológicas, a HEC e a piometra devem ser classificadas separadamente. É comum a piometra ser definida como um complexo endometrite/HEC/piometra (ARORA et al., 2006).

Há um consenso de que as lesões observadas na piometra são resultado de uma interação hormonal e participação bacteriana. Apesar dos vários estudos sobre o tema, clinicamente, a síndrome piometra ainda representa um desafio para a maioria dos profissionais, sendo difícil estabelecer um prognóstico preciso (DE COCK et al., 1997; FERREIRA e LOPES, 2000; WEISS et al., 2004; MARTINS, 2007).

A piometra pode se apresentar de forma aberta ou fechada, caracterizada pela presença ou ausência de secreção vaginal, respectivamente. A cérvix é considerada uma barreira física prevenindo a infecção ascendente pela secreção de muco e constrição e a abertura ou fechamento da cérvix são ciclo dependente. Na mulher, a dilatação cervical durante o parto correlaciona-se com a extensão do infiltrado de neutrófilos, entretanto, os mecanismos de dilatação cervical nas cadelas não são totalmente esclarecidos (CHATDARONG et al., 2008).

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 à 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 progesterona para prevenir a gestação (SMITH, 2006; MARTINS, 2007).

Os diagnósticos diferenciais de piometra são mucometra, endometrite pós parto, hiperplasia cística do endométrio, vaginite, abortamento, gestação, piometra de coto, estro, neoplasias vaginais, síndrome do ovário remanescente (BIGLIARDI et al., 2004; SMITH, 2006; OLIVEIRA, 2007).

O tratamento da piometra pode ser terapêutico ou cirúrgico de acordo com o estado geral do paciente e finalidade reprodutiva. O fator determinante sobre o tipo de tratamento escolhido é a gravidade do processo inflamatório e a avaliação clínica

(OLIVEIRA, 2007), mas deve ser imediato e eficaz, pois a sepse e endotoxemia podem estar presentes ou em desenvolvimento.

No caso das cadelas com piometra, o prognóstico é sempre reservado. O isolamento de bactérias gram-negativas em útero de cadelas com piometra está associado com sinais sistêmicos mais severos. Animais com maiores concentrações plasmáticas de endotoxinas têm pior prognóstico (SILVA et al., 2009).

Nos casos mais graves a doença está associada com endotoxemia, sepse e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), atingindo uma taxa de mortalidade de 3-4%. Outra complicação associada é a peritonite séptica, atingindo uma mortalidade de 68% (HAGMAN et al., 2009).

A piometra canina é provavelmente a doença mais severa do útero de cadelas, sendo responsável por um índice elevado de mortalidade quando não diagnosticada precocemente. Apesar dos vários estudos sobre o tema, a piometra ainda representa um desafio para a maioria dos profissionais, sendo difícil estabelecer um prognóstico precoce e seguro, portanto o objetivo desta proposta é avaliar aspectos clínicos, hormonais, microbiológicos e imunoistoquímico da piometra aberta e fechada na tentativa de estabelecer diferenças entre as duas condições.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar de forma comparativa cadelas apresentando piometra de cérvix aberta e fechada.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1- Caracterização do hemograma e perfil renal de cadelas portadoras de piometra aberta e fechada.

2- Avaliação das concentrações de progesterona plasmática de fêmeas portadoras de piometra aberta e fechada.

3- Caracterização do perfil bacteriano de secreções uterinas e conteúdo vesicais, além da sensibilidade aos principais antibióticos em cadelas portadoras de piometra.

4- Avaliação imunoistoquímica dos receptores de estrógeno α , receptores de estrógeno β , receptores de progesterona, colágeno I e colágeno III da cérvix e no endométrio canino numa tentativa de estabelecer o mecanismo relacionado a abertura/fechamento da cérvix.

5- Correlação entre a idade das pacientes, ocorrência de pseudogestação, número de gestações e administração exógena de hormônio e o diagnóstico da piometra.

Revisão de Literatura

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. FISIOPATOGENIA

Dentre os hormônios que participam do ciclo estral das cadelas podemos citar o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH), estrógeno e progesterona. Sobre a influência do FSH, os folículos ovarianos se desenvolvem e as células foliculares produzem estrógenos que estimulam a proliferação das células epiteliais da mucosa vaginal, o aumento da espessura da camada endometrial, promovem abertura da cérvix, aumentam o fluxo sanguíneo e a resposta inflamatória celular. As respostas ou efeitos provocados pelos hormônios estrógeno e progesterona no útero têm efeito cumulativo a cada ciclo estral (OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

De acordo com Goericke-Pesch et al (2010), as estruturas típicas que formam o útero das cadelas são o epitélio superficial, a lâmina própria com glândulas, estruturas vasculares e a túnica muscular. A distribuição das glândulas por milímetros quadrado (mm²) é significativamente menor no meio e na porção caudal do que na cranial da cérvix e uma correlação significativa pode ser verificada entre as concentrações de progesterona e o número de glândulas por mm². Essa condição pode estar associada com um mecanismo de defesa imune proporcionando uma barreira para ascensão de bactérias ao útero.

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

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

Ainda é desconhecido o processo pelo qual podemos diferenciar a formação de piometra aberta ou fechada. Algumas hipóteses já foram levantadas, sendo a de Weiss et al (2004), bastante expressiva. Ao analisar a concentração hormonal de cadelas apresentando piometra, o estradiol não apresentou diferença significativa: piometra aberta, $43 \pm 6,5$ pg/mL; fechada, $56,3 \pm 11,9$ pg/mL. Quanto a análise da progesterona os resultados foram significativos sendo de $4,8 \pm 0,9$ ng/mL para a piometra aberta e $13,2 \pm 5,5$ ng/mL para a piometra fechada.

A patência da cérvix é regulada pela musculatura lisa, tecido fibroso e elastina. A remodelação da matriz extracelular tem um papel importante na dilatação cervical pela degradação do colágeno. Em trabalho realizado por Chatdarong et al (2010) foi postulado que o útero de cadelas cíclicas tem uma maior proporção de colágeno comparado com a musculatura lisa, provavelmente associada ao aumento do estradiol durante o estro, isso leva a uma diminuição da resistência a tração, causando o relaxamento da cérvix. Resultado semelhante é observado nas cadelas com piometra de cérvix aberta, sugerindo que a abertura do colo uterino é associada a um aumento na proporção de colágenos frente a fibras musculares.

De acordo com Chatdarong et al (2008), as expressões de receptores de estrógeno (ER) e de progesterona (PR) na cérvix de cadelas são influenciadas pelo estágio do ciclo estral e a infiltração neutrofílica no tecido cervical parece estar envolvida na dilatação cervical de cadelas com piometra.

Cadelas com piometra apresentam níveis plasmáticos de prostaglandina mais elevados se comparados com cadelas controle ou que apresentam apenas uma HEC. Este diagnóstico diferencial permite ao clínico decidir entre otimizar recursos e adiar uma cirurgia, em casos de HCE, ou a necessidade de uma OSH emergencial, no caso de piometra (HAGMAN et al., 2006).

3.2. RECEPTORES UTERINOS

O estrógeno induz a proliferação das glândulas endometriais e a progesterona induz a ramificação, sendo também responsável pelo início da secreção glandular para o lúmen uterino (DE COCK et al., 1997).

Pesquisas estão sendo focadas nas concentrações de receptores hormonais no endométrio e suas implicações no desenvolvimento da piometra. A expressão dos ERs e PRs são mais elevadas no útero de cadelas com HEC, mas não no útero de cadelas com piometra. Anticorpos monoclonais para receptores de estrógeno humanos foram utilizados para detectar a presença de receptores de estrógeno no útero de cadelas normais e com HCE. Como resultado obteve-se uma diferença importante, um maior número de receptores em cadelas com HCE, como era esperado, já que os estrógenos são os responsáveis pela proliferação das glândulas do endométrio uterino (DE COCK et al., 1997; DE BOSSCHERE et al., 2002a; DE BOSSCHERE et al., 2002b; DE BOSSCHERE et al., 2003).

Investigações têm explorado a possibilidade da piometra ser induzida por uma resposta exagerada do útero a níveis normais de hormônios (VERVERIDIS et al., 2004). A expressão de receptores parece ser diferente no útero comprometido com HCE e piometra comparado com o útero de cadelas sadias (DE COCK et al., 1997; VERVERIDIS et al., 2004).

De Bosschere et al (2002b) avaliaram, por ensaio imunoistoquímico, a expressão dos ERs e PRs no útero de cadelas normais, com piometra e com HEC. As contagens dos ERs e PRs foram mais elevadas nos animais com HEC quando comparados ao útero de cadelas normais ou portadoras de piometra, sendo que a menor contagem foi verificada em cadelas com piometra. As diferenças na expressão de receptores sugerem fatores distintos na patogênese de ambas entidades. Assim, pode-se pensar que a piometra é desencadeada por uma cascata de eventos iniciada pela infecção bacteriana.

Em consequência da expressão significativamente aumentada do ER em cadelas com HEC, o endométrio permanece receptivo ao hormônio mesmo com níveis baixos de estrógeno circulante. Isto pode esclarecer a contínua proliferação das glândulas endometriais durante o estágio de forte influência da progesterona. A ação prolongada e

simultânea do estrógeno e da progesterona pode explicar as mudanças na proliferação cística que são características da piometra (DE COCK et al., 1997).

Cadelas com piometra apresentam concentrações menores de receptores de estrógenos quando comparadas a cadelas controle em diestro ou início de anestro. No entanto, concentrações séricas de estrógeno em cadelas com piometra são significativamente mais elevadas do que em cadelas saudáveis durante as respectivas fases, mas não alcançam as concentrações observadas no proestro e estro (VERVERIDIS et al., 2004).

Kida et al (2006) estudaram a expressão de lactoferrina no útero através da imunoistoquímica de cadelas com piometra e em ciclos estrais normais. Nesse estudo, os níveis de lactoferrina apresentaram-se mais elevados nas fases de proestro, estro e em cadelas com piometra e drasticamente menores no diestro. Essa glicoproteína pode ser controlada, positivamente, pela concentração de estrógenos, sendo diminuída pela crescente concentração de progesterona. Talvez a rápida redução da lactoferrina no diestro, juntamente, com baixa atividade da imunidade celular, facilite a instalação de bactérias no útero, já que essa proteína é bacteriostática ligando-se as membranas das bactérias e diminuindo a concentração de ferro ao seu redor.

Bartoskova et al (2009) através do método de ELISA concluíram que as concentração média de lactoferrina no soro em cadelas com piometra foi de $47,8 \pm 11,7$ ng/mL, significativamente maior do que o grupo controle de cadelas com úteros normais e machos onde a concentração média foi $14,4 \pm 2,0$ ng/mL. Os autores relatam que o soro de cadelas com piometra foi capaz de suprimir a atividade dos linfócitos, porém, a influência dessa supressão permaneceu a mesma após a remoção da lactoferrina do soro. Sendo assim, essa glicoproteína não teria um papel crucial na supressão da atividade dos linfócitos.

Para avaliar o desenvolvimento de hiperplasia endometrial cística acompanhada de piometra foi realizado um estudo da expressão gênica e da localização de receptores através de imunoistoquímica e reação em cadeia de polimerase (PCR). O fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento transformador α (TGF α) e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R) foram comparados nos endométrios de cadelas normais e de cadelas com piometra. Apenas o EGF-R foi superior em cadelas com piometra, portanto, podem contribuir para o crescimento

anormal de glândulas uterinas e podem estar envolvidos na patogênese da piometra (KIDA et al., 2010).

3.3. AGENTES ETIOLÓGICOS

A interação da progesterona e do estrógeno é importante no desenvolvimento da piometra, mas a progressão e severidade dessa enfermidade é complicada com a migração secundária de bactérias, via ascendente. O acúmulo de secreção constitui um excelente meio de cultura para o crescimento bacteriano que também é facilitado pela inibição da resposta leucocitária. Em aproximadamente 80% dos casos de piometra, tem-se resultado positivo para isolamento bacteriano (DOW, 1959). Na fase de diestro, o papel secundário das bactérias é comprovado pelos resultados negativos obtidos nos estudos que objetivaram induzir piometra experimental através da inoculação de bactérias no útero de cadelas em diferentes fases do ciclo estral.

Ainda em relação às bactérias, sabe-se que a vagina de fêmeas caninas sadias não constitui um ambiente estéril. Vários microorganismos aeróbicos que causam infecção uterina estão presentes na microbiota normal da vagina de cadelas sugerindo uma infecção ascendente (JOHNSTON et al., 2001).

A bactéria isolada com maior frequência no útero de cadelas com piometra é a *Escherichia coli*, isolada de 57% a 96% das amostras de exsudato uterinos. Ocasionalmente, outras bactérias como *Staphilococcus schleiferi*, *Staphilococcus epidermidis*, *Streptococcus sp*, *Streptococcus canis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa* são isoladas do útero de animais infectados (HAGMAN e KUHN, 2002; COGGAN et al., 2004; WESS et al., 2004; BARTOSKOVA et al., 2007). A origem destes microorganismos é o próprio intestino e o trato urinário (COGGAN et al., 2004; WESS et al., 2004; BARTOSKOVA et al., 2007).

Coggan et al (2004) realizaram cultura do conteúdo uterino de cadelas com piometra e em 87,8% das amostras foi isolado algum agente microbiológico. Considerando as amostras onde houve crescimento de microorganismos, foram isolados os seguintes agentes: *E. coli* (79,16%), *Staphilococcus schleiferi* (2,7%), *Staphilococcus epidermidis* (2,7%), *Streptococcus sp* (2,7%), *Streptococcus canis* (1,35%), *Klebsiella pneumoniae* (2,7%), *Morganella morganii* (2,7%) e *Pseudomonas aeruginosa* (2,7%).

A *E. coli* está inserida dentro do Gênero *Escherichia*, Família *Enterobacteriaceas*. Trata-se de um bastonete gram negativo representante das bactérias anaeróbias facultativas. A maioria das linhagens é móvel por possuírem flagelos peritricos típicos das *Enterobacteriaceas*, o que justifica a sua capacidade de infecção ascendente (SYDOW, 2005).

A liberação de lipopolissacarídeos da parede celular da *E. coli* resulta em ativação de neutrófilos e macrófagos e no aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias. A produção dessas citocinas durante a piometra é um dos principais fatores que provocam danos irreversíveis aos órgãos internos, em alguns casos, levando ao choque séptico e morte (DABROWSKI et al., 2009).

Estirpes de *E. coli* isoladas em úteros de cadelas com piometra foram submetidas ao estudo dos fatores de virulência *pap* (pilus associado a pielonefrite), *sfa* (Fímbria S), *era* (aerobactinas) e *cnf* (fator citotóxico necrosante). Dessas estirpes, 69,56% foram positivas para *sfa*, 39,13% positivas para *pap*, 17,4% positivas para *aer* e 8,7% positivas para *cnf* (COGGAN et al., 2004; SIDOW, 2005).

Certos sorotipos de *E. coli*, como 02, 04, 06, 075 e 032 são, geralmente, os mais isolados em conteúdos uterinos. A presença do antígeno K, um fator de virulência importante da *E. coli* que induz a cistite, também tem sido isolado de cadelas com piometra (FRANSON e RAGLE, 2003).

Os fatores de virulência nas estirpes de *E. coli* (*pap*, *sfa*, *era* e *cnf*) isolados de amostras do conteúdo uterino com piometra as caracterizam como uropatológicas. Estes fatores de virulência provocam destruição tecidual através das exotoxinas, enzimas hidrolíticas, produtos bacterianos que induzem resposta auto-imune e endotoxemias (SYDOW, 2005).

Fatores de virulência *pap* podem contribuir para a aderência das bactérias e colonização do trato urinário e útero, e este fator é frequentemente associado a pielonefrite. *Pap C* foi encontrado em 23,5 % das infecções do trato urinário e 36,5 % dos casos de piometra. *Pap G* pode ser encontrado em três variantes (classe I, II, III), sendo o alelo II geralmente associado a pielonefrite. Este alelo foi observado em 22 % das cepas de cães com infecção urinária, 5,8 % das linhagens obtidas a partir de casos de piometra e 17 % das cepas isoladas de seres humanos. Portanto, a presença de *pap G II* em cepas de *E. coli* a partir de amostras uterinas reforça o fato da pielonefrite ser uma das mais sérias complicações da piometra (SIQUEIRA et al., 2009).

Siqueira et al (2009) identificaram uma alta frequência de fatores de virulência em *E. coli* isoladas de cadelas com piometra e infecções do trato urinário. Estes fatores de virulência também foram identificados em infecções urogenitais em seres humanos, reforçando a idéia de que os cães podem ser reservatórios de *E. coli* patogênica para o homem.

3.4. SINAIS CLÍNICOS

A piometra é diagnosticada em quase 25% de todas as cadelas não castradas, antes dos 10 anos de idade, sendo caracterizada por inflamação crônica do útero com presença de bactérias (HAGMAM et al., 2009).

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

Cadelas com piometra aberta apresentam secreção vaginal que pode ser abundante, variando de coloração, entre vermelho escuro e amarelo. Já na piometra fechada, as cadelas podem apresentar distensão e sensibilidade abdominal dolorosa. Outros sinais encontrados no quadro de piometra incluem letargia, depressão, anorexia, hiporexia, poliúria, polidipsia, vômitos, hipertermia, hipotensão, desidratação, taquicardia (DE BOSSCHERE et al., 2001; VAN ISRAEL et al., 2002).

A maioria dos sinais clínicos da piometra é inespecífico e pode atingir o trato urinário devido ao comprometimento dos órgãos envolvidos no equilíbrio hidroeletrolítico. Wheaton et al (1989) avaliaram 80 casos de piometra e encontraram como sinais clínicos mais frequentes: secreção vaginal (80%), apatia (79%), anorexia (79%), polidipsia (63%), febre (43%), útero palpável (40%), poliúria (38%), vômitos (33%), diarreia (26%) e desidratação (15%). Embora a polidipsia e a poliúria não sejam sinais patognomônicos de piometra, quando apresentados por uma fêmea não castrada, devem ser fortemente considerados em um diagnóstico presuntivo de piometra, pelo menos até a pesquisa de outras causas (PRESTES et al., 1991; JOHNSTON et al., 2001).

No trabalho de Hagman et al (2011) foram estudadas 87 cadelas com piometra, os sinais mais comumente encontrados foram corrimento vaginal (84%), estado geral deprimido (83%), hiporexia (72%), polidipsia (72%) e desidratação (43%).

Cadelas com piometra de cérvix fechada podem apresentar síndrome de choque tóxico, podendo chegar a morte. Êmese, letargia, hipertensão, pulso fraco, dermatite, também podem ser observados e desaparecem sete dias após remoção cirúrgica do útero (DECLERCQ, 2007).

Cadelas apresentando piometra são afetadas pela síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) em 57% dos casos, baseando-se em valores de temperatura corporal, frequência cardíaca e proteína C reativa no plasma (FRANSSON et al., 2006).

3.5. EXAMES LABORATORIAIS

O diagnóstico de piometra geralmente não é difícil, principalmente quando a cérvix está aberta, com presença de secreção. A associação entre o histórico, sinais clínicos e exame físico apresentados quase sempre fecham o diagnóstico. Os recursos de imagens e exames laboratoriais são fundamentais para definir o diagnóstico em casos de piometra de cérvix fechada. (OLIVEIRA, 2007).

Os exames laboratoriais que auxiliam o médico veterinário no diagnóstico definitivo incluem hemograma completo, bioquímico e urinálise. Em estudo utilizando 17 cadelas com diagnóstico definitivo de piometra aberta, Barros et al (2005) relataram que as alterações de hemograma são características de processo inflamatório, com grande estimulação antigênica.

Em cadelas com piometra, estudos hematológicos destacaram um aumento considerável de glóbulos brancos, com aumento de neutrófilos e monócitos e queda diretamente proporcional de linfócitos. Esse quadro ocorre em 75% dos casos (BIGLIARDI et al., 2004). Sete dias após a OSH, o total de leucócitos diminuiu, consideravelmente, não apresentando qualquer diferença com o leucograma de um cão saudável (BARTOSKOVA et al., 2007).

Como todos os animais com piometra possuem um potencial para desenvolver doença pré-renal ou insuficiência renal primária, a urinálise, além da creatinina, favorecem o diagnóstico e a instituição da terapia suporte adequada a cada caso. As principais alterações observadas na urinálise em estudos de cadelas com piometra foram: diminuição da densidade (< 1030) e proteinúria (JOHNSTON et al., 2001).

Cadelas com piometra têm inibição das atividades dos linfócitos que pode ser explicada por uma gama de fatores que incluem imunoglobulinas, lipoproteínas e, principalmente, a endotoxemia causada pela *E. coli*, também responsável por quadros de anemia normocítica normocrômica não regenerativa de leve a moderada (BARTOSKOVA et al., 2007).

Nos casos de piometra como resultado da infecção e septicemias é comum leucogramas inflamatórios com grandes números de leucócitos e bandas de neutrófilos. A anemia pode ser justificada devido a supressão da medula óssea pelas toxinas das bactérias e/ou pelo sequestro de eritrócitos para o útero, resultando na diminuição da eritropoiese (DEMIEL e KUPLULU, 2010).

Dois estudos laboratoriais de cadelas com piometra revelaram que os parâmetros mais confiáveis para diferenciar um quadro de piometra de um quadro de hiperplasia cística do endométrio foram as bandas de neutrófilos, concentrações de fibrinogênio e as concentrações de proteína C reativa no plasma. No caso de piometra observa-se uma leucocitose com desvio a esquerda, um aumento de quase duas vezes na concentração de fibrinogênio justificada pelo processo inflamatório da doença e um aumento de quase nove vezes nas concentrações plasmáticas de proteína C reativa como resultado de alterações imunológicas, neuroendócrinas e metabólicas (FRANSSON et al., 2004; CARVALHO et al., 2008).

No exame bioquímico encontram-se alterações como hiperproteinemia, hipoalbuminemia, bilirrubinemia, creatinina e uréia elevadas, assim como azotemia devido a lesão pré-renal e renal causada por imunocomplexos, alterações no equilíbrio ácido básico, aumento da enzima aspartato amino transferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) (BIGLIARDI et al., 2004; FRANSSON et al., 2004; BARTOSKOVA et al., 2007; KUPLULU et al., 2009).

Considerando os parâmetros bioquímicos séricos, os níveis de ALT, uréia e creatinina foram consideravelmente maiores nos casos em que as cadelas apresentaram níveis superiores de toxinas. Essa correlação positiva direcional foi encontrada entre os níveis de uréia e creatinina frente as mortes e aos casos de sobrevivência. Os óbitos ocorreram nos cães com maiores níveis de creatinina e uréia, concluindo que nesses casos os cães apresentavam maiores concentrações de toxinas (DEMIREL e KUPLULU, 2010).

No estudo de Kuplulu et al (2009) foi comparado os exames bioquímicos entre cadelas com úteros normais, cadelas com piometra que sobreviveram a OSH e cadelas que foram a óbito devido a piometra . As cadelas que morreram apresentaram o maior valor de uréia e creatinina em relação aos outros grupos. A diferença entre os grupos não foi significativa quando comparados os valores de enzimas hepáticas. Todos os animais que vieram a óbito apresentaram azotemia, associada a lesões renais, fibrose intersticial e atrofia tubular causada por agentes bacterianos. A concentração de uréia e creatinina, juntamente com a concentração de neutrófilos podem ser utilizados como um preditor de prognóstico.

O valor clínico da mensuração do lactato sanguíneo em predizer o prognóstico, a determinação de perfusão tecidual e a avaliação da resposta ao tratamento têm sido bem documentado em humanos. Tanto a concentração de lactato na fase inicial, quanto a duração da hiperlactatemia podem ser usadas para prever a sobrevivência ou morte dos pacientes. Em pacientes com sepse, os níveis de lactato foram estreitamente relacionados com a gravidade da doença e acidose metabólica. O achado de lactato em níveis normais ou baixos em cadelas com piometra indicam que o prognóstico é bom e o risco anestésico e cirúrgico são menores do que em cães hiperlactatêmicos (HAGMAM et al., 2009).

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa em questão atendeu aos requisitos impostos pela Comissão de Ética no uso de animais de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus Botucatu, recebendo o protocolo número 26/2009 – CEEA.

Foram utilizadas 31 cadelas com diagnóstico de piometra atendidas na área de Reprodução de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP campus Botucatu. O diagnóstico foi realizado através de histórico clínico, exames físico e complementares: hemograma, uréia, creatinina e avaliação ultrassonografia.

Do total de cadelas, 25, apresentavam secreção vaginal purulenta, mucopurulenta ou sanguinolenta e 6 apresentavam piometra de cérvix de fechada. Destas fêmeas foram coletadas sangue para dosagem plasmática de progesterona e urina para cultura microbiológica e antibiograma. Após o procedimento da OSH foram coletados fragmentos da cérvix e do útero para a avaliação imunoistoquímica dos receptores de progesterona, estrógeno α e β e colágenos I e III, além do conteúdo uterino para cultura e antibiograma.

4.1. Anamnese

Os proprietários foram estimulados a responder uma ficha clínica que continha questionamentos a respeito de idade, alimentação, ambiente, doenças anteriores, tratamentos realizados, histórico reprodutivo anterior e atual (anexo1).

4.2. Animais

Foram utilizados neste estudo 31 animais com idades entre 3 e 17 anos, com média de 8,5 anos, das raças fox paulista (n = 2), pit bull (n = 3), boxer (n = 5), poodle (n = 2), pincher (n = 1), pastor alemão (n = 2), cocker spaniel (n = 1), maltês (n = 1), rottweiler (n = 1) e cães sem raça definida (n = 13), pesando entre 3 e 42 Kg, com média de 18 Kg, com diagnóstico de piometra.

4.3. Hemograma e perfil renal

Uma amostra de aproximadamente 5mL de sangue foi retirada por venopunção da veia jugular de cada cadela para realização de hemograma completo: hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM (volume corpuscular médio), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), proteína total no plasma, RDW (*red cell distribution width*), plaquetas, leucócitos, bastonetes, segmentado, linfócitos, eosinófilos e monócitos e perfil renal (creatinina e uréia). O sangue foi transferido para frascos sem anticoagulante (Vacuplast Estéril Acelerador[®]) para a realização do exame bioquímico e em frascos com anticoagulante (BD Vacutainer[®] K2 EDTA 7.2mg – USA) para realização de hemograma. Os tubos foram encaminhados imediatamente ao Laboratório Clínico do Hospital Veterinário – UNESP-Botucatu.

A contagem do número total de hemácias, leucócitos e plaquetas foram realizadas em contador automático de células (Hemascreen – Ebram[®]). A determinação da hemoglobina foi realizada pelo método da cianometahemoglobina (Hemascreen – Ebram[®]) e o volume globular pelo método do microhematócrito (Hemascreen – Ebram[®]). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células em esfregaços corados por Romanowsky.

Para análise da uréia as amostras foram processadas no mesmo dia por meio de kit comercial e leitura em espectrofotometria (Espectrofotômetro SB-190 CELM[®]). A creatinina pelo método colorimétrico por reação cinética com o picrato alcalino (Creatinina cinética – CELM[®]).

4.4. Dosagem plasmática de progesterona

O sangue coletado por venopunção de veia jugular em frascos com anticoagulante (BD Vacutainer[®] K2 EDTA 7.2mg - USA) foi levado imediatamente ao laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres onde foi centrifugado (Centrífuga LS-3 – Celm[®] - 1700x g) por 10 minutos para obtenção do plasma, que foi identificado com o nome e número de registro dos animais e armazenado a temperatura de -18°C até o momento da avaliação hormonal.

Após descongelação em temperatura ambiente, todas as amostras de plasma foram avaliadas em duplicata quanto às suas concentrações de progesterona. As

dosagens foram realizadas utilizando-se *kits* comerciais em fase sólida (Coat A – Count Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, Califórnia, USA), com leitura por sistema de radioimunoensaio (Packard Cobra II Auto Gamma- GMI Inc. – Minnesota - USA) seguindo-se as instruções do fabricante. As dosagens de progesterona foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 0,99.

4.5. Ovariosalpingohisterectomia (OSH)

A técnica de OSH, como forma de tratamento para a piometra, foi realizada de forma convencional em todos os animais. Foi utilizado fio vicryl ethicon[®] para ligadura de pedículos ovarianos e transfixação do coto uterino, assim como para a sutura da camada muscular, em pontos sultan e aproximação do subcutâneo com pontos contínuos em cushing. Para o fechamento da pele foi utilizado nylon monofilamentoso 3-0 e pontos simples separados.

4.6. Cultura e Antibiógrama

Durante o procedimento cirúrgico, através de cistocentese foi coletado 3 ml de urina e após o término da cirurgia, uma amostra de 3 ml do conteúdo uterino foi coletada por punção aspirativa. Imediatamente, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus Botucatu.

As amostras foram semeadas em meio de ágar Mac Conkey e base de ágar sangue composta com 7% de sangue ovino desfibrinado. Em seguida, as amostras foram incubadas em condições de aerobiose à 37°C e observadas em 24, 48 e 72 horas (KONEMAN, 2001a).

Para as amostras que apresentaram isolamentos positivos, realizou-se análise macroscópica, microscópica (morfotintorial pelo método de Gram) e bioquímica, seguindo as provas taxonômicas segundo Carter (1994).

As amostras coletadas para o antibiógrama seguiram a metodologia sugerida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). O meio de cultivo para o

antibiograma foi ágar Mueller-Hinton, distribuído em placas de Petri de 14 cm de diâmetro interno.

Foram selecionadas e repicadas 4 ou 5 colônias sob teste para 5 mL de meio de cultivo em caldo. O caldo inoculado foi incubado por 2 a 8 horas à temperatura de 37°C, deixando assim o microrganismo crescer até atingir a turbidez padrão ou ajustando se necessário.

A turbidez padrão foi preparada à base de Cloreto de Bário e Ácido sulfúrico da seguinte maneira: 0,5 mL de 0,048M BaCl₂ adicionado a 99,5mL de 0,18M, que corresponde a 0,5 da escala de Mac Farland.

Dentro de 15 minutos após o ajustamento da turbidez, foi introduzido um swab estéril e não tóxico no inoculo, para colheita de amostra bacteriana, sendo o material assim obtido distribuído homogeneamente pela superfície da placa de Petri para posterior colocação dos discos com os antimicrobianos a serem testados.

Os discos para antibiograma SENSIFAR[®] foram colocados sobre a superfície da placa com o auxílio de uma pinça estéril. A distância mínima entre os discos foi de 24 mm entre seus respectivos centros. Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas a 37 °C, sendo que a leitura das placas foi realizada após 24 horas de incubação. A leitura foi realizada com as medidas dos diâmetros das zonas de inibição, as quais foram comparadas com medidas internacionais “National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS”; classificando o resultado como sensível, parcialmente sensível ou resistente (KONEMAN, 2001b).

Foram utilizados os seguintes antibióticos: a ampicilina (10mcg), amoxicilina associada a ácido clavulânico (30mcg), cefalexina (30mcg), cefalotina (30mcg), doxiciclina (30mcg), enrofloxacina (5mcg), ciprofloxacina (5mcg) e sulfa associada a trimetoprim (25mcg).

4.7. Imunoistoquímica

Os fragmentos uterinos e cervicais foram fixados em formol tamponado 10% durante 24 horas e, posteriormente, mantidos em álcool 70% até o momento de inclusão em parafina, realizada no Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu. Após a inclusão, cortes de 3 µm foram obtidos, montados em lâminas com extremidade

fosca e corados inicialmente em HE para avaliar a qualidade do material. Posteriormente novos cortes de 3 μm foram realizados e colocados em lâminas com extremidade fosca, previamente tratadas com Poly-L-lysina (Poly-L-lisine[®] – Sigma Chemical Co.- USA).

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

Posteriormente as lâminas foram submetidas a dez passagens de água destilada. A partir desta etapa o tratamento se difere para cada antígeno pesquisado:

- Receptores de estrógeno α : para a detecção de receptores de estrógeno α realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako-USA). A etapa seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos (2 banhos de 10 minutos cada), 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico[®]) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base[®]-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:50 (anticorpo Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor α clone 1D5 - Dako – CA, USA. Cód M7047.), em câmara úmida durante 18h à temperatura de 4°C.
- Receptores de estrógeno β : para a detecção de receptores de estrógeno β realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM com incubação em microondas, potência máxima - 750W, durante 15 minutos (três ciclos de cinco minutos cada). A etapa seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos (2 banhos de 10 minutos cada), 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó

desnatado (Molico®) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4. Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:100 (anticorpo Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen β clone PPG5/10, Dako, USA. Cód. M7292), em câmara úmida durante 18h à temperatura de 4°C.

- Receptores de progesterona: para a detecção de receptores de progesterona realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM com incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako-USA). A etapa seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos (2 banhos de 10 minutos cada), 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico®) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4. Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:50, para os receptores de progesterona (anticorpo monoclonal cat. No 1546, Immunotech, France), em câmara úmida durante 18h à temperatura de 4°C.
- Colágeno I e III: para a detecção de colágeno I e III realizou-se recuperação antigênica em pepsina 1% pH 1,8 (Pepsina 1:1000 NF- Nuclear SP-Brasil) com incubação em estufa a 60°C por 10 minutos e em seguida 37° por 20 minutos. A etapa seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos (2 banhos de 10 minutos cada), 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó desnatado (Molico®) 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4. Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:2000, para colágeno I e III (Rabbit anti bovine col I IgA Novotec. Ref. 20121; Rabbit anti bovine col III IgA Novotec. Ref. 2930, respectivamente) em câmara úmida durante 18h à temperatura de 4°C.

As próximas etapas são semelhantes para todos os antígenos. Após as 18 horas de incubação com o anticorpo primário em câmara úmida a 4°C, o material foi então submetido a banhos de TRIS e, posteriormente, incubado com o anticorpo secundário Advance (Advance, Dako, USA) por 30 minutos cada etapa, ainda em câmara úmida,

segundo instruções do fabricante. Realizou-se nova lavagem com solução tampão TRIS - pH 7,4, e revelação com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina - Liquid DAB Cromogen[®] – Dako – USA) durante 5 minutos ao abrigo da luz e novamente lavagem com solução tampão TRIS - pH 7,4.

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer por 30 segundos, e a coloração interrompida com lavagem em água corrente por 10 minutos e cinco passagens em água destilada.

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

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

Depois de todas as lâminas confeccionadas e identificadas realizou-se a leitura:

- Receptores de estrógeno α , estrógeno β e progesterona: as regiões avaliadas na cérvix foram o epitélio luminal, epitélio glandular e o estroma. No útero os tecidos avaliados foram o epitélio glandular e o estroma. Para avaliar a imunomarcção foram utilizados dois métodos. No primeiro, em cada um desses tecidos foram contados 300 núcleos, sendo considerados positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azul.

No segundo método a intensidade das marcações foi avaliada de forma subjetiva em fraca, moderada e forte, recebendo respectivamente escore 1, 2 e 3 para a análise estatística. Foram lidos 10 campos aleatórios, sendo todos os campos homogêneos (mais de 80% dos núcleos com a mesma intensidade). As avaliações foram realizadas em um microscópio de luz no aumento 400 vezes.

- Colágeno I e III : a mesma forma de avaliação foi empregada para o útero e a cérvix. Dois métodos foram utilizados para avaliar a imunomarcção. No primeiro, dez campos aleatórios nos tecidos muscular e estroma eram

observados em microscópio de luz no aumento 100 vezes. Cada campo recebia escore de 1 (menos de 25% do campo corado de marrom), 2 (26% a 50%), 3 (51% a 75%) ou 4 (acima de 75%). A média dos campos foi realizada calculando o escore definitivo daquela lâmina. No segundo método a intensidade foi classificada de forma subjetiva como fraco (menos de 20% das fibras coradas), moderado (26% a 75%) e forte (acima de 76%).

4.8. Estatística

Para as variáveis do eritrograma, leucograma, dosagem plasmática de progesterona, uréia e creatinina e análises imunoistoquímicas foram utilizados a comparação das medidas entre os grupos através do teste de Mann-Whitney.

Para comparação dos resultados médios entre os grupos de piometra aberta e piometra fechada utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney. A fim de detectar diferenças significativas entre os grupos, foi considerando $p < 0,05$.

A frequência das intensidades dos núcleos positivos (fraco, moderado e forte) entre as regiões estudadas foi realizado teste qui-quadrado/exato do teste de Fisher. Nos casos em que houve uma associação significativa, realizou-se a partição da tabela qui-quadrado, onde se comparou as frequências entre os locais estudados.

As avaliações das culturas uterinas e vesicais, assim como seus antibiogramas foram analisadas de acordo com a relação entre as bactérias isoladas do conteúdo uterino e de urina a partir da correlação de Spearmam, do teste exato de Fisher e da concordância Kappa. O primeiro teste analisa a relação entre a sensibilidade das bactérias (resistente, parcialmente sensível ou sensível) isoladas do conteúdo uterino e na urina. O teste exato de Fisher verificou se a proporção de bactérias de determinado tipo no útero diferiam dos tipos encontrados na urina. Por fim, o teste Kappa analisou a concordância dos tipos de bactérias encontradas no útero e na urina.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. ERITROGRAMA E LEUCOGRAMA

Os resultados referentes ao leucograma e eritrograma dos animais portadores de piometra aberta e fechada estão apresentados na tabela 01 e 02.

TABELA 01: Valores médios e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) das variáveis do leucograma: leucócitos, bastonetes, segmentados, linfócitos, eosinófilos e monócitos para os animais dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.

Variáveis	Grupo	Média	Desvio Padrão	p-valor M-W
Leucócitos (/μL)	PA	21502,4	10651,0	0,230
	PF	26550,0	10879,5	
Bastonetes (%)	PA	2,0	2,8	0,553
	PF	2,0	1,8	
Segmentados (%)	PA	82,5	6,4	0,980
	PF	82,8	5,2	
Linfócitos (%)	PA	7,6	4,6	0,237
	PF	5,0	1,9	
Eosinófilos (%)	PA	1,6	2,1	0,876
	PF	1,5	1,8	
Monócitos (%)	PA	6,1	3,8	0,236
	PF	8,3	6,1	

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

TABELA 02: Valores médios e desvio padrão ($x \pm s$) das variáveis: hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, CHCM, Proteína plasmática, RDW, Plaquetas do eritrograma para os animais dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.

Variáveis	Grupo	Média	Desvio Padrão	p-valor M-W
Hemácias (/μL)	PA	5,0	1,4	0,726
	PF	5,4	1,4	
Hemoglobina(g/dL)	PA	11,9	3,4	0,980
	PF	12,9	2,9	
Hematócrito (%)	PA	34,4	9,3	0,920
	PF	36,7	9,6	
VCM (fL)	PA	68,9	5,2	0,726
	PF	70,5	6,3	
CHCM (%)	PA	34,3	2,6	0,745
	PF	34,4	1,5	
PT plasma (g/dL)	PA	8,2	1,3	0,616
	PF	7,8	0,6	
RDW (%)	PA	14,5	1,5	0,688
	PF	14,0	0,6	
Plaquetas (/μL)	PA	236293,0	146241,8	0,424
	PF	284995,8	132387,0	

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

Não houve diferença significativa entre os grupos piometra aberta e fechada em relação ao leucograma e ao eritrograma.

5.2. FUNÇÃO RENAL

Os valores médios de creatinina e uréia dos animais do grupo piometra aberta e do grupo piometra fechada estão representados na tabela 03.

TABELA 03: Valores médios e desvio padrão ($x \pm s$) da creatinina e uréia dos animais dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.

Medidores	Grupo	Média	Desvio Padrão	p-valor M-W
Creatinina (mg/dL)	PA	1,3	0,8	0,071
	PF	0,9	0,4	
Uréia (mg/dL)	PA	52,1	43,7	0,516
	PF	29,6	6,2	

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

Não foi constatada diferença significativa entre os grupos estudados referentes a função renal.

5.3. DOSAGEM PLASMÁTICA DE PROGESTERONA

Os resultados referentes às concentrações de progesterona plasmáticas estão apresentados na tabela 04.

TABELA 04: Valores médios e desvio padrão ($x \pm s$) das dosagens plasmáticas de progesterona (ng/mL) dos animais dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.

Medições	Grupo	Média	Desvio padrão	p-valor M-W
P4-Média	PA	8,2	8,7	0,920
	PF	5,6	3,1	

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

5.4. CULTURA E ANTIBIOGRAMA

Para análise das bactérias isoladas foi realizada uma tabela de contingência entre as bactérias isoladas do conteúdo uterino, da urina e os resultados negativos. Os resultados estão representados na tabela 05.

As tabelas 06 e 07 foram realizadas para demonstrar as bactérias do grupo piometra aberta e piometra fechada isoladas no conteúdo uterino e na urina respectivamente.

TABELA 05: Número de fêmeas e bactérias isoladas: *Escherichia coli* (E. coli), *Enterobacter* sp (Entero), *Streptococcus* sp (Strepto), *Alcaligenes faecalis* (Alcal), *Klebsiella pneumoneae* (Klebs), *Edwardsiella tarda* (Edward) no conteúdo uterino, vesical e culturas negativas. Botucatu, 2011.

Útero Urina	Neg	E.coli	Entero	Strepto	Alcal	Klebs	Edward
Neg	3	10	4	3	1	1	0
E. coli	0	10	0	0	0	0	0
Entero	0	0	1	0	0	0	0
Strepto	0	0	0	0	0	0	1
Alcal	0	0	0	0	1	0	0

Considerando p-valor < 0,05

Teste de Fisher: p-valor < 0,001

TABELA 06: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) avaliando as bactérias isoladas do útero: *Escherichia coli* (E. coli), *Enterobacter* sp (Entero), *Streptococcus* sp (Strepto), *Alcaligenes faecalis* (Alcal), *Klebsiella pneumoneae* (Klebs) e *Edwardsiella tarda* (Edward). Botucatu, 2011.

		Cultura Útero							p-valor Fisher
		Negativo	<i>E. coli</i>	<i>Entero.</i>	<i>Strepto.</i>	<i>Alcal.</i>	<i>Klebs.</i>	<i>Edward.</i>	
Grupo	P.A.	2	17	4	2	2	1	0	28
	P.F.	1	3	1	1	0	0	1	7
	Total	3	20	5	3	2	1	1	35

Considerando p-valor < 0,05

TABELA 07: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) avaliando as bactérias isoladas na urina: *Escherichia coli* (E. coli), *Enterobacter* sp (Entero), *Streptococcus* sp (Strepto) e *Alcaligenes faecalis* (Alcal). Botucatu, 2011.

		Cultura Urina					p-valor Fisher
		Negativo	<i>E. coli</i>	<i>Entero.</i>	<i>Strepto.</i>	<i>Alcal</i>	
Grupo	P.A.	16	9	1	0	1	27
	P.F.	4	1	0	1	0	6
	Total	20	10	1	1	1	33

Considerando p-valor < 0,05

As culturas que apresentaram crescimento bacteriano foram submetidas ao antibiograma (Fig.01), usando para isso os antibióticos ampicilina, amoxicilina associada a ácido clavulânico, cefalexina, cefalotina, ceftiofur, doxiciclina, enrofloxacina, ciprofloxacina e sulfa associada a trimetoprim. Todos os antibióticos receberam uma classificação de resistente, parcialmente sensível e sensível. Os resultados estão demonstrados nos Apêndices 02 a10.

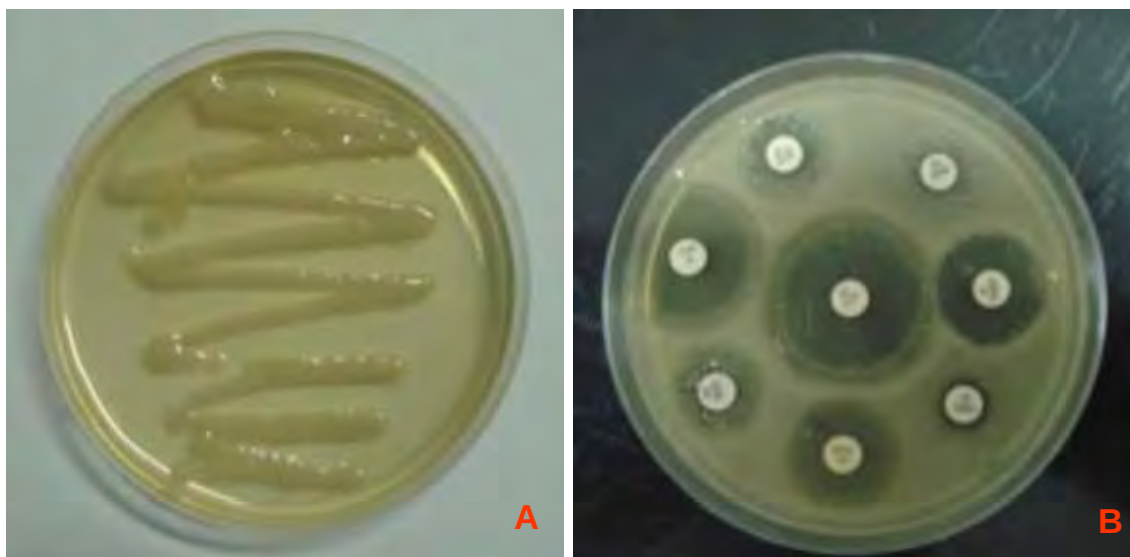


Figura 01: Imagens das placas utilizadas para cultura e antibiograma, sendo “A” crescimento bacteriano de uma amostra semeada em meio de ágar Mac Conkey e “B” teste de antibiograma através da medição das zonas de inibição (VOLPATO et al, 2008)

Com a intenção de analisar diferenças entre as bactérias do grupo piometra aberta e do grupo piometra fechada, foram realizadas tabelas de contingência avaliando os tipos de bactérias do conteúdo uterino e vesical e sua sensibilidade frente aos antibióticos testados. Os resultados estão demonstrados nos Apêndices 11 a 30. Não foi possível detectar uma associação significativa entre os grupos.

5.5. IMUNOISTOQUÍMICA

5.5.1. Receptores de Estrógenos α

Foram avaliados receptores de estrógeno α no endométrio e na cérvix. Os resultados estão demonstrados nas tabelas 08 a 13.

TABELA 08: Valores médios e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) dos núcleos considerados positivos (imunomarcados) para receptores de estrógeno α no epitélio glandular (RE α _cérv_gland), estroma (RE α _cérv_estroma) e epitélio luminal (RE α _cérv_epitel) da cérvix e epitélio glandular (RE α _útero_gland) e estroma (RE α _útero_estroma) no endométrio das cadelas dos grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.

Região tecidual	Grupo	Média	Desvio Padrão	p-valor M-W
RE α _útero_gland	PA	267,3	20,0	0,072
	PF	252,7	23,5	
RE α _útero_estroma	PA	95,4	54,5	0,802
	PF	116,7	100,0	
RE α _cérv_gland	PA	277,9	8,9	0,394
	PF	281,5	4,9	
RE α _cérv_estroma	PA	127,9	71,1	0,317
	PF	142,5	75,6	
RE α _cérv_epitel	PA	238,2	42,0	0,240
	PF	225,0	32,1	

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

Não foi constatada diferença significativa na imunomarcção dos receptores de estrógeno α entre as diversas regiões da cérvix e útero analisadas e entre os grupos piometra aberta ou piometra fechada.

TABELA 09: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando como variável a intensidade da imunomarcção - fraco, moderado e forte para receptores de estrógeno α na região glandular do útero. Botucatu, 2011.

		RE α – glandular do útero			Total	p-valor
		fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	10	11	4	25	0,846
	P.F.	3	3	0	6	
	Total	13	14	4	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 10: Comparação dos grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando como variável a intensidade de imunomarcção - fraco, moderado e forte para receptores de estrógeno α na região do estroma uterino. Botucatu, 2011.

		RE α – estroma do útero			Total	p-valor
		fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	22	2	1	25	0,598
	P.F.	5	1	0	6	
	Total	27	3	1	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 11: Comparação dos grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando como variável a intensidade da imunomarcção - fraco, moderado e forte para receptores de estrógeno α na região glandular da cérvix. Botucatu, 2011.

		RE α – glandular do cérvix			Total	p-valor
		fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	7	11	7	25	1,000
	P.F.	1	3	2	6	
	Total	8	14	9	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 12: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando como variável a intensidade de imunomarcção - fraco, moderado e forte para receptores de estrógeno α na região do estroma cervical. Botucatu, 2011.

		RE α – estroma do cérvix			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	18	5	2	25	0,465
	P.F.	3	2	1	6	
	Total	21	7	3	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 13: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando como variável a intensidade de imunomarcações - fraco, moderado e forte para receptores de estrógeno α na região do epitélio luminal cervical. Botucatu, 2011.

		RE α – epitélio do cérvix			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	16	8	1	25	0,447
	P.F.	3	2	1	6	
	Total	19	10	2	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

Não foi demonstrada diferença estatística entre os grupos piometra aberta e fechada, quando se avaliou a intensidade de imunomarcção dos receptores de estrógeno α relacionadas a região tecidual do útero e da cérvix. Em vista disso os animais foram agrupados (n=31 cadelas) para o estudo da intensidade de imunomarcção nas diferentes regiões do útero e da cérvix de animais com piometra; os resultados estão expressos nas tabelas 14 e 15.

TABELA 14: Porcentagem das imunomarcações - fraco, moderado e forte, para receptores de estrógeno α nas regiões do epitélio glandular e estroma do útero de animais portadores de piometra (n= 31). Botucatu, 2011.

Receptor de estrógeno α - Útero			p-valor
Intensidade	Glandular	Estroma	
Fraco	41,9% (13/31)	87,1% (27/31)*	0,001
Moderado	45,2% (14/31)*	9,7% (03/31)	
Forte	12,9% (04/31)*	3,2% (01/31)	
Total	100,0% (31/31)	100,0% (31/31)	

* na mesma linha representa diferenças entre as regiões, considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

Houve diferença significativa entre a intensidade de imunomarcação dos receptores de estrógeno α entre os tecidos estudados. A concentração de receptores de estrógeno α foi maior no epitélio glandular do que no estroma.

TABELA 15: Porcentagem das imunomarcações - fraco, moderado e forte, para receptores de estrógeno α nas regiões do epitélio luminal, epitélio glandular e estroma da cérvix de animais portadores de piometra (n= 31). Botucatu, 2011.

Receptor de estrógeno α - Cérvix				p-valor
Intensidade	Glandular	Estroma	Luminal	
Fraco	25,8% (08/31) ^b	67,7% (21/31) ^a	61,3% (19/31) ^a	0,005
Moderado	45,2% (14/31) ^a	22,6% (07/31) ^b	32,3% (10/31) ^{ab}	
Forte	29,0% (09/31) ^a	9,7% (03/31) ^b	6,5% (02/31) ^b	
Total	100,0% (31/31)	100,0% (31/31)	100,0% (31/31)	

Letras minúsculas na mesma linha significam diferenças entre as regiões, considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

Houve diferença significativa entre a intensidade de imunomarcação para receptores de estrógeno α em relação as regiões teciduais avaliadas. As concentrações de receptores estrógeno α foram maiores no epitélio glandular da cérvix. As concentrações mais fracas foram observadas no epitélio luminal.

5.5.2. Receptores de Estrógeno β

Foram avaliados receptores de estrógeno β no endométrio e na cérvix de animais portadores de piometra aberta e fechada. Os resultados estão demonstrados na tabela 16 a 21.

TABELA 16: Valores médios e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) dos núcleos positivos (imunomarcados) para receptores de estrógeno β no epitélio glandular (RE β _cérv_gland), estroma (RE β _cérv_estroma) e epitélio luminal (RE β _cérv_epitel) da cérvix e epitélio glandular (RE β _útero_gland) e estroma (RE β _útero_estroma) do útero de cadela com piometra aberta e fechada. Botucatu, 2011.

Região tecidual	Grupo	Média	Desvio Padrão	p-valor M-W
RE β _útero_gland	PA	275,2	15,3	0,565
	PF	279,3	9,9	
RE β _útero_estroma	PA	224,6	41,3	0,960
	PF	224,7	30,4	
RE β _cérv_gland	PA	283,2	12,1	0,783
	PF	283,3	9,6	
RE β _cérv_estroma	PA	223,5	57,1	0,861
	PF	231,8	28,9	
RE β _cérv_epitel	PA	281,0	11,8	0,635
	PF	279,3	9,9	

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

Não houve diferença significativa na imunomarcagem dos receptores de estrógeno β entre as diversas regiões da cérvix e útero e entre os grupos piometra aberta ou fechada.

TABELA 17: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de estrógeno β na região glandular do útero. Botucatu, 2011.

		RE β – glandular do útero			Total	p-valor
		fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	7	9	9	25	0,449
	P.F.	0	3	3	6	
	Total	7	12	12	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 18: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de estrógeno β na região do estroma uterino. Botucatu, 2011.

		RE β – estroma do útero			Total	p-valor
		fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	5	8	12	25	1,000
	P.F.	1	2	3	6	
	Total	7	12	12	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 19: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de estrógeno β na região glandular da cérvix. Botucatu, 2011.

		RE β – glandular cérvix			Total	p-valor
		fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	4	9	12	25	1,000
	P.F.	1	2	3	6	
	Total	5	11	15	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 20: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de estrógeno β na região do estroma cervical. Botucatu, 2011.

		RE β – estroma cérvix			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	3	14	8	25	1,000
	P.F.	1	3	2	6	
	Total	4	17	10	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 21: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de estrógeno β na região do epitélio cervical. Botucatu, 2011.

		RE β – epitélio cérvix			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	3	8	14	25	1,000
	P.F.	0	2	4	6	
	Total	3	10	18	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

Não foi demonstrada diferença estatística entre os grupos piometra aberta e fechada, quando se avaliou a intensidade de imunomarcação dos receptores de estrógeno β relacionada a região tecidual do útero e da cérvix. Em vista disso, os animais foram agrupados (n=31 cadelas) para o estudo da intensidade de imunomarcação nas diferentes regiões do útero e da cérvix de animais com piometra; os resultados estão expressos nas tabelas 22 e 23.

TABELA 22: Intensidade das imunomarcações – forte, moderado e fraco para receptores de estrógeno β nas regiões do epitélio glandular e estroma do útero de cadelas portadoras de piometra (n=31). Botucatu, 2011.

Receptor de estrógeno β – Útero			p-valor
Intensidade	Glandular	Estroma	
Fraco	22,6% (07/31)	19,4% (06/31)	0,744
Moderado	38,7% (12/31)	32,3% (10/31)	
Forte	38,7% (12/31)	48,4% (15/31)	
Total	100,0% (31/31)	100,0% (31/31)	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 23: Intensidade das imunomarcações – forte, moderado e fraco para receptores de estrógeno β nas regiões do epitélio luminal, epitélio glandular e estroma da cérvix de cadelas portadoras de piometra (n=31). Botucatu, 2011.

Receptor de estrógeno β – Cérvix				p-valor
Intensidade	Glandular	Estroma	Luminal	
Fraco	16,1% (05/31)	12,9% (04/31)	9,7% (03/31)	0,293
Moderado	35,5% (11/31)	54,8% (17/31)	32,3% (10/31)	
Forte	48,4% (15/31)	32,3% (10/31)	58,1% (18/31)	
Total	100,0% (31/31)	100,0% (31/31)	100,0% (31/31)	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

Não houve diferenças significativas entre as concentrações de receptores para estrógeno β entre as diferentes regiões da cérvix e útero de animais portadores de piometra.

5.5.3. Receptores de Progesterona

TABELA 24: Valores médios e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) dos núcleos positivos (imunomarcados) para receptores de progesterona nas regiões do epitélio glandular (RP4_cérv_gland), estroma (RP4_cérv_estroma) e epitélio luminal (RP4_cérv_epitel) da cérvix e epitélio glandular (RP4_útero_gland) e estroma (RP4_útero_estroma) do útero entre os grupos piometra aberta e fechada. Botucatu, 2011.

Região tecidual	Grupo	Média	Desvio Padrão	p-valor M-W
RP4_útero_gland	PA	277,7	14,1	0,861
	PF	278,0	12,5	
RP4_útero_estroma	PA	258,6	27,1	0,841
	PF	264,2	11,4	
RP4_cérv_gland	PA	260,3	19,2	0,484
	PF	264,5	29,9	
RP4_cérv_estroma	PA	185,6	49,4	0,803
	PF	189,5	68,6	
RP4_cérv_epitel	PA	243,2	25,2	0,707
	PF	223,7	58,4	

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

Não foi possível determinar diferença significativa na imunomarcção entre os diferentes tecidos analisados e entre os grupos piometra aberta e piometra fechada.

TABELA 25: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de progesterona na região glandular do útero. Botucatu, 2011.

		RP4 – glandular do útero			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	3 ^b	16 ^a	6 ^b	25	0,009
	P.F.	2 ^b	0 ^c	4 ^a	6	
	Total	5	16	10	31	

Letras minúsculas na mesma linha representam diferenças entre regiões, considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

Houve diferença significativa na concentração de receptores para progesterona entre os grupos piometra aberta e fechada na região do epitélio glandular do útero. As concentrações de receptores de progesterona foram maiores nas piometras fechadas do que nas abertas.

TABELA 26: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de progesterona na região do estroma uterino. Botucatu, 2011.

		RP4 – estroma do útero			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	8	11	6	25	0,860
	P.F.	2	2	2	6	
	Total	10	13	8	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 27: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de progesterona na região glandular da cérvix. Botucatu, 2011.

		RP4 – glandular do cérvix			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	13	8	4	25	0,619
	P.F.	2	2	2	6	
	Total	15	10	6	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 28: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de progesterona na região do estroma cervical. Botucatu, 2011.

		RP4 – estroma do cérvix			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	5	7	13	25	1,000
	P.F.	1	1	4	6	
	Total	6	8	17	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 29: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para receptores de progesterona na região do epitélio cervical. Botucatu, 2011.

		RP4 – epitélio do cérvix			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	14	9	2	25	0,071
	P.F.	4	0	2	6	
	Total	18	9	4	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

Os animais foram agrupados (n=31 cadelas) para o estudo da intensidade de imunomarcção nas diferentes regiões do útero e da cérvix de animais com piometra; os resultados estão expressos nas tabelas 30 e 31.

TABELA 30: Intensidade das imunomarcações – forte, moderado e fraco para receptores de progesterona nas regiões do epitélio glandular e estroma do útero. Botucatu, 2011.

Receptor de progesterona - Útero			p-valor
Intensidade	Glandular	Estroma	
Fraco	16,1% (05/31)	32,3% (10/31)	0,333
Moderado	51,6% (16/31)	41,9% (13/31)	
Forte	32,3% (10/31)	25,8% (08/31)	
Total	100,0% (31/31)	100,0% (31/31)	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 31: Intensidade das imunomarcações – forte, moderado e fraco para receptores de progesterona nas regiões do epitélio luminal, epitélio glandular e estroma da cérvix. Botucatu, 2011.

Receptor de progesterona - Cérvix				p-valor
Intensidade	Glandular	Estroma	Luminal	
Fraco	48,4% (15/31) ^a	19,4% (06/31) ^b	58,1% (18/31) ^a	0,002
Moderado	32,3% (10/31) ^a	25,8% (08/31) ^a	29,0% (09/31) ^a	
Forte	19,4% (06/31) ^b	54,8% (17/31) ^a	12,9% (04/31) ^b	
Total	100,0% (31/31)	100,0% (31/31)	100,0% (31/31)	

Letras minúsculas na mesma linha representam diferenças entre regiões, considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

Houve diferença significativa nas concentrações de receptores de progesterona na cérvix. As concentrações de receptores de progesterona foram maiores na região do estroma, quando comparados com o epitélio glandular e luminal.

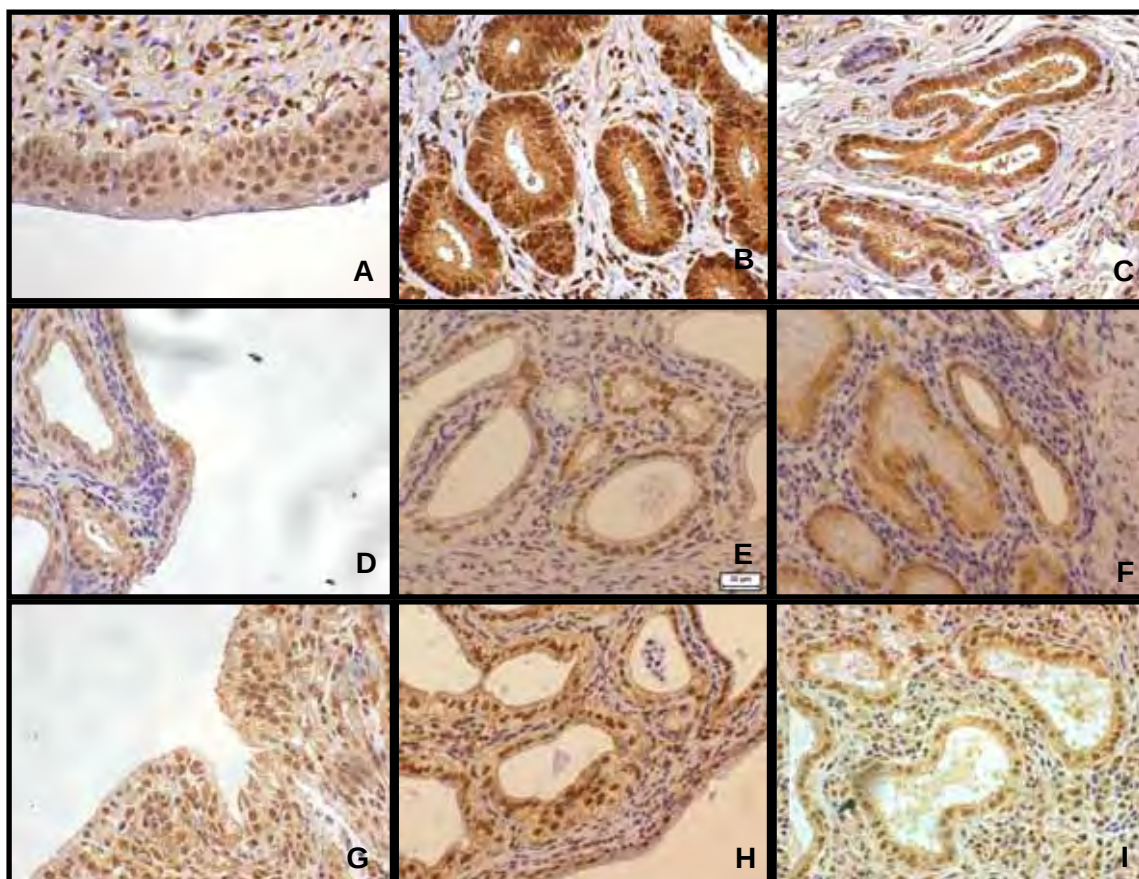


Figura 02: Detecção imunoistoquímica, sendo considerados núcleos positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles corados em azuis. “A” receptores de progesterona no epitélio luminal da cérvix, aumento 400X; “B” receptores de progesterona no epitélio glandular e estroma da cérvix, “C” receptores de progesterona no epitélio glandular e estroma do útero, “D” receptores de estrógeno α no epitélio luminal da cérvix, “E” receptores de estrógeno α no epitélio glandular e estroma da cérvix, “F” receptores de estrógeno α no epitélio glandular e estroma do útero, “G” receptores de estrógeno β no epitélio luminal da cérvix, “H” receptores de estrógeno β no epitélio glandular e estroma da cérvix, “I” receptores de estrógeno β no epitélio glandular e estroma do útero, aumento 200X. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

5.5.4. Colágeno I e III

Foram realizadas imunomarcações para colágenos I (Fig.03) (Tabela 32) e III (Fig.04) (Tabela 33) nas regiões glandular e muscular do útero e da cérvix.

TABELA 32: Valores médios e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) das áreas imunomarcadas para colágeno I, nas regiões glandular (Col_I_Gland_Cérvix) e muscular (Col_I_Musc_Cérvix) da cérvix e glandular (Col_I_Gland_Útero) e muscular (Col_I_Musc_Útero) do útero, entre os grupos piometra aberta (PA) e fechada (PF). Botucatu, 2011.

Região tecidual	Grupo	Média	Desvio Padrão	p-valor
Col_I_Gland_Útero	PA	1,6	1,0	0,536
	PF	2,0	1,4	
Col_I_Musc_Útero	PA	1,4	0,4	0,919
	PF	1,5	0,6	
Col_I_Gland_Cérvix	PA	1,3	0,4	0,650
	PF	1,6	1,0	
Col_I_Musc_Cérvix	PA	2,1	0,7	0,633
	PF	2,4	1,1	

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

TABELA 33: Valores médios e desvio padrão ($x \pm s$) das áreas imunomarcadas para colágeno III, nas regiões glandular (Col_III_Gland_Cérvix) e muscular (Col_III_Musc_Cérvix) da cérvix, e glandular (Col_III_Gland_Útero) e muscular (Col_III_Musc_Útero) do útero, entre os grupos piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF). Botucatu, 2011.

Região Tecidual	Grupo	Média	Desvio Padrão	p-valor
Col_III_Gland_Útero	PA	2,1	1,1	0,646
	PF	2,6	1,5	
Col_III_Musc_Útero	PA	1,9	0,9	0,920
	PF	2,0	1,0	
Col_III_Gland_Cérvix	PA	1,6	0,6	0,631
	PF	2,1	1,2	
Col_III_Musc_Cérvix	PA	2,3	0,9	0,724
	PF	2,6	1,2	

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

Não foi possível determinar diferença estatística entre os grupos de piometra aberta e piometra fechada em nenhuma das regiões teciduais analisadas para colágeno I e III.

TABELA 34: Comparação entre os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para colágeno I na cérvix. Botucatu, 2011

		Colágeno I – cérvix			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	14	11	0	25	0,115
	P.F.	3	2	1	6	
	Total	17	13	1	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 35: Comparação dos grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para colágeno I no útero. Botucatu, 2011.

		Colágeno I – útero			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	18	5	2	25	0,810
	P.F.	4	1	1	6	
	Total	22	6	3	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 36: Comparação dos grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para colágeno III na cérvix. Botucatu, 2011.

		Colágeno III – cérvix			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	9	14	2	25	0,235
	P.F.	2	2	2	6	
	Total	11	16	4	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

TABELA 37: Comparação dos grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.) utilizando a intensidade - fraco, moderado e forte das imunomarcações para colágeno III no útero. Botucatu, 2011.

		Colágeno III – útero			Total	p-valor
		Fraco	moderado	forte		
Grupo	P.A.	12	10	3	25	0,498
	P.F.	2	2	2	6	
	Total	14	12	5	31	

Considerando teste de Fisher p-valor < 0,05

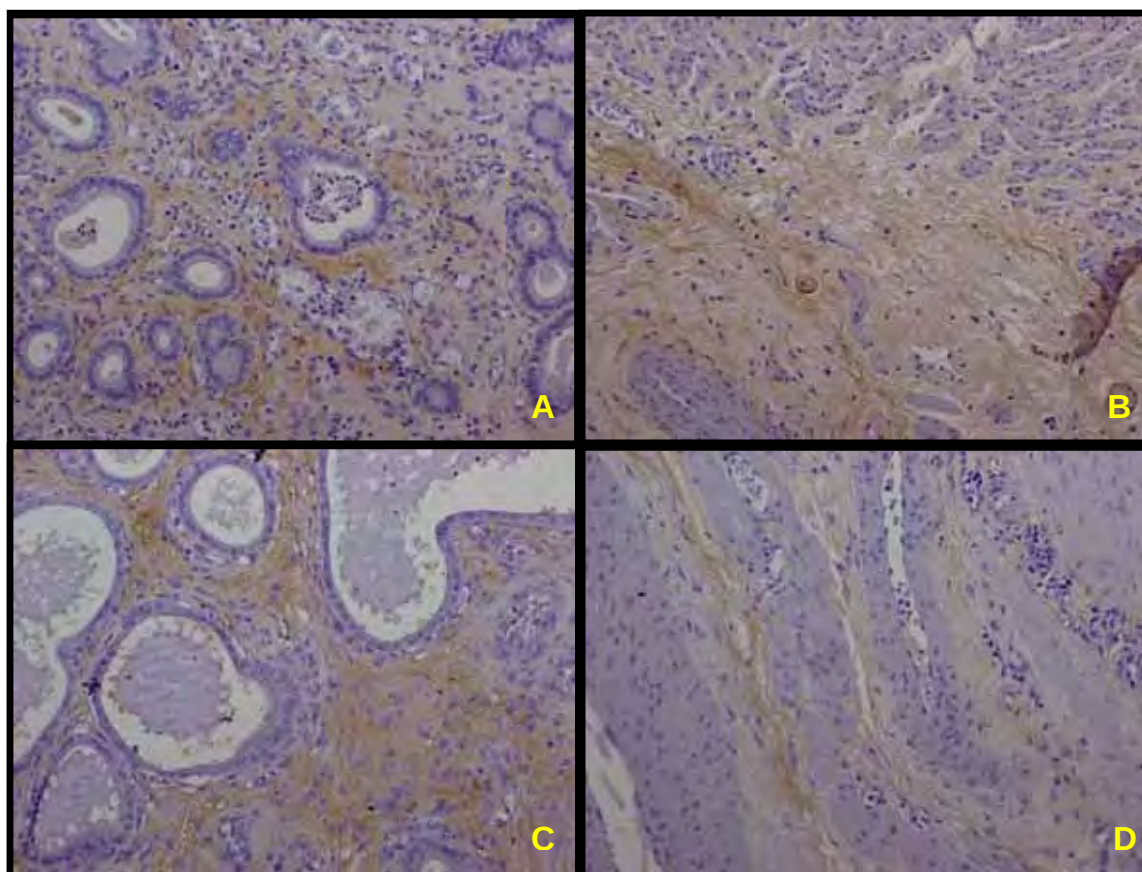


Figura 03: Imunomarcacão para colágeno I representado na coloração marrom, aumento de 200X, sendo “A” região estroma da cérvix, “B” região muscular da cérvix, “C” região glandular do útero e “D” região muscular do útero. Imunoistoquímica, DAB, contra coloração hematoxilina de Harris.

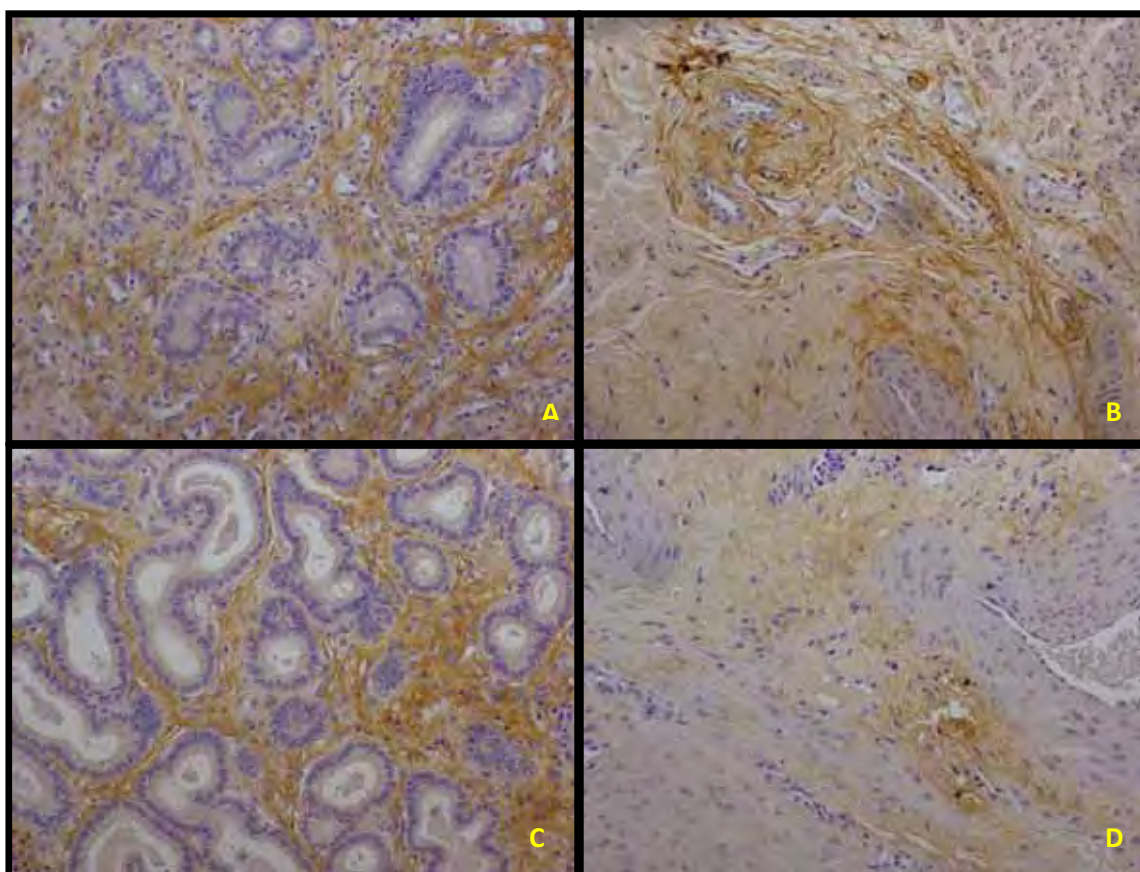


Figura 04: Imunomarcacão para colágeno III representado na coloraco marrom, aumento de 200X, sendo “A” região estroma da cérvix, “B” região muscular da cérvix, “C” região glandular do útero e “D” região muscular do útero. Imunoistoquímica, DAB, contra coloraco hematoxilina de Harris.

Discussão

6. DISCUSSÃO

A piometra é uma enfermidade frequente em cadelas não castradas, adultas ou idosas e se não diagnosticada e tratada precocemente pode levar o animal a morte. A despeito de décadas de pesquisa alguns pontos na patogenia da piometra ainda não são completamente elucidados. Da mesma forma, os mecanismos envolvidos na abertura e fechamento da cérvix não são conhecidos. As piometras abertas são menos tóxicas e mais fáceis de serem tratadas e se os mecanismos de relaxamento cervical fossem esclarecidos poderíamos no mínimo estimular a abertura cervical e induzir a eliminação do conteúdo uterino.

O objetivo desse estudo foi aumentar nosso entendimento sobre a etiologia dessa doença principalmente no tocante a abertura e/ou fechamento cervical. A piometra é uma doença diagnosticada principalmente na fase do diestro do ciclo estral e mesmo com concentrações elevadas de progesterona a maioria dos casos de piometra é aberta.

A piometra canina se desenvolve como resultado de vários fatores etiológicos, incluindo a influência hormonal, a virulência da bactéria invasora, a habilidade do animal combater a infecção e a sensibilidade individual aos produtos inflamatórios e bacterianos.

Para a realização deste estudo trabalhou-se com cadelas de idade variando de 3 a 17 anos, média de 8,5 anos. Dessas fêmeas, apenas 3 receberam hormônios exógenos e a pseudogestação não foi referida por nenhum proprietário.

No grupo piometra aberta, constituído por 25 animais, 20 eram nulíparas e no grupo piometra fechada, apenas uma. Esse resultado corrobora com a literatura que afirma ser a piometra uma enfermidade mais frequente em cadelas nulíparas (SMITH, 2006; MARTINS, 2007). A incidência da piometra aberta foi maior do que a de piometra fechada. O grupo da piometra aberta foi constituído de 25 fêmeas e o grupo da piometra fechada de apenas 6 e esse número reflete a rotina de atendimento do setor de Reprodução de Pequenos Animais em um determinado período, reforçando a incidência maior da forma aberta.

Sendo a piometra aberta a forma mais frequente, a secreção vaginal é o sinal mais observado pelos proprietários, é a forma menos tóxica da doença e apresenta uma possibilidade de tratamento clínico. Algumas cadelas com piometra aberta podem, durante o curso da doença, apresentar um fechamento da cérvix, assim como cadelas

com piometra fechada podem vir a apresentar abertura cervical. Esse mecanismo de abertura e fechamento cervical pode ser devido a interações hormonais, ou pode ser apenas um fator mecânico pela pressão exercida pelo próprio acúmulo de secreção no interior do útero. De qualquer forma, esse mecanismo necessita de maiores estudos.

Não houve diferença entre os casos de piometra aberta e fechada relacionada ao eritrograma. As cadelas com piometra diagnosticada neste experimento apresentaram, em sua maioria, uma anemia do tipo normocítica normocrômica não regenerativa (hematócrito ao redor de 35%) e uma leucocitose por neutrofilia, com desvio à esquerda. Este quadro é característico da piometra sendo descrito por inúmeros autores (BARROS et al., 2005; BARTOSKOVA et al., 2007; DEMIEL e KUPLULU, 2010).

Utilizando os valores de referência descritos por Feldman e Nelson (2004), ambos os grupos – piometra aberta e fechada, apresentaram uma anemia do tipo normocítica normocrômica leve, ou seja, hemácias, hemoglobina e hematócrito diminuídos. Segundo Cançado e Chiattonne (2002), a anemia pode variar de leve a severa e ocorre possivelmente devido a uma diminuição da sobrevivência das hemácias, a uma falha da medula óssea em aumentar a produção de glóbulos vermelhos para compensar o aumento da sua demanda, e a distúrbio da mobilização do ferro de depósito do sistema mononuclear fagocitário. Devido ao estado de hiperatividade do sistema mononuclear fagocitário desencadeado pelo processo infeccioso e inflamatório, ocorre uma remoção precoce dos eritrócitos circulantes e, portanto, uma diminuição da sobrevivência das hemácias.

Outros fatores, como a hipertermia, podem causar danos à membrana eritrocitária e liberação de hemolisinas, a liberação de toxinas bacterianas também pode levar à condição de hiper-hemólise. A resposta medular inadequada observada nos casos de piometra deve-se basicamente à baixa secreção de eritropoetina, à diminuição da resposta da medula óssea e à diminuição da eritropoiese consequente da menor oferta de ferro. Esse ferro é armazenado nos macrófagos levando à diminuição da eritropoiese. Todo processo inflamatório crônico é capaz de aumentar a síntese e a liberação de citocinas endógenas que, por sua vez, induzem a alterações do metabolismo do ferro e diminuição da síntese da hemoglobina (CANÇADO e CHIATTONE, 2002).

Neste estudo quatro cadelas do grupo piometra aberta (4/25) apresentaram uma anemia normocítica normocrômica severa, com o hematócrito variando de 16 a 21% e os valores de hemácias entre 1,99 e 2,85 milhões/mm³. Dessas 4 fêmeas, 3 também

apresentaram um número de plaquetas baixo, variando de 89.000 a 139.000/ μ L caracterizando um quadro de trombocitopenia. Nesses casos, em particular, não foi possível a exclusão de doenças concomitantes como hemoparasitose.

As cadelas atendidas pela área de Reprodução Animal e diagnosticadas com piometra, na sua grande maioria (70,77%) apresentavam uma infestação por carrapatos podendo apresentar *erlichiose* canina isolada ou em associação com a piometra. Entretanto, desses animais apenas 1,85% apresentaram diagnóstico de *Erlichia sp* no esfregaço sanguíneo (MARCEU et al., 2010).

Em relação ao leucograma os animais apresentaram uma leucocitose com desvio a esquerda, essa leucocitose foi principalmente devido a um aumento do número de bastonetes, o que está de acordo com a literatura e com um quadro de infecção bacteriana (SMITH, 2006; SCHLAFFER e GIFFORD, 2008; ÂNGULO, 2009). Um leucograma inflamatório não é uma descoberta surpreendente em uma doença caracterizada por inflamação crônica como a piometra.

A leucocitose reflete uma resposta à infecção e sepse. Nos casos mais severos ou crônicos, pode ocorrer um desvio à esquerda degenerativo com neutrófilos tóxicos (STOCKHAM, 2000; FELDMAN e NELSON, 2004). Levando-se em consideração os valores individuais, no grupo das cadelas com piometra fechada, uma cadela (1/6) apresentou leucograma normal e no grupo piometra aberta, sete (7/25), apresentaram leucograma normal. Geralmente, cadelas com piometra aberta podem apresentar leucograma normal devido à eliminação do conteúdo uterino purulento através do relaxamento cervical, mas as cadelas com piometra fechada apresentam leucocitose, geralmente acima de 16.000/ μ L devido ao acúmulo de material purulento que atrai células polimorfonucleares para o lúmen uterino.

Duas cadelas se destacaram por apresentarem leucocitose acima de 40.000/ μ L, ambas do grupo piometra aberta, provavelmente devido ao estímulo antigênico exercido pela infecção bacteriana e o diagnóstico tenha coincidido com uma resposta aguda do animal. Da mesma maneira que o eritrograma, não foi observado diferença significativa entre os grupos piometra aberta e fechada quando comparou-se os leucogramas.

Os animais com piometra possuem um potencial para desenvolver doença pré-renal ou insuficiência renal primária, sendo assim, exames bioquímicos tornam-se importantes para o prognóstico e terapia suporte. Nesse estudo não houve diferença entre os grupos analisados quando consideramos as variáveis creatinina e uréia. A

média dos valores de uréia e creatinina de cada grupo estão incluídas dentro do considerado normal para a espécie canina de acordo com os valores de referência descritos por Feldman e Nelson et al (2004). Portanto, os resultados observados nesse trabalho são consistentes com função glomerular normal.

Os resultados de creatinina e uréia observados nessa pesquisa não condizem dos valores encontrados por Johnston et al (2001), Kuplulu et al (2009), Demirel e Kuplulu (2010) que relataram um aumento no valor dessas variáveis, em contrapartida, estão de acordo com os descritos por Verstegen et al (2008). A enfermidade renal e a evolução clínica da doença a longo prazo em cães com piometra é pouco definida. Acreditava-se que as lesões renais em caso de piometra eram causadas pela deposição de imunocomplexos nos glomérulos decorrentes da infecção, mas temos que considerar que o diagnóstico de piometra é realizado comumente em fêmeas adultas ou idosas, e uma diminuição da função renal pode representar apenas um processo decorrente do envelhecimento normal. No estudo de Heiene et al (2007), as cadelas foram divididas em um grupo com piometra e um grupo de cadelas hípidas, com idades pareadas. Esses autores concluíram que as doenças renais associadas à piometra são semelhantes aquelas observadas em cães idosos. Características específicas de glomerulonefrite não foram diagnosticadas em cães com piometra.

Quatro das 26 cadelas do grupo piometra aberta utilizadas neste experimento apresentaram concentração de creatinina e uréia acima do considerado normal. Estes animais apresentavam idade entre 8 e 15 anos e condição de hidratação considerada normal. Alguns fatores como idade, tempo de evolução da doença podem interferir no estado geral do animal minimizando ou agravando as lesões renais pré existentes. Um dos exames necessários para diferenciar piometra com falha renal concomitante de piometra com uremia pré renal é a densidade urinária. Se a densidade urinária for inferior a 1006, uma diabetes insipidus nefrogênica secundária adquirida é provável, se ao contrário, a densidade urinária for superior a 1030 uma uremia pré renal deve ser considerada. Com uma densidade urinária variando de 1008 a 1020 juntamente com desidratação o clínico deve reavaliar o histórico clínico do animal, outras alterações bioquímicas como a concentração de cálcio e fósforo, realizar RX e US abdominais para diferenciar essas duas situações (FELDMAN e NELSON, 2004)

Estudos futuros deverão definir com clareza a natureza do dano glomerular agudo a fim de aperfeiçoar o atendimento do paciente após a resolução da piometra. Os dados não são consistentes com a noção comum de que a piometra necessariamente induz a uma glomerulonefrite imunomediada. A literatura atual é ambígua neste ponto. Depósitos de imunocomplexos são documentados em cães sem piometra, principalmente em cães idosos (HEIENE et al., 2007).

O acúmulo de secreção purulenta no interior do útero, nos casos de piometra, constitui um excelente meio de cultura para o crescimento bacteriano. Em aproximadamente 80% dos casos de piometra obtém-se resultado positivo para isolamento bacteriano e geralmente são bactérias da microbiota normal da vagina, sendo a mais frequente, *Escherichia coli*, isolada de 57% a 96% das amostras (DOW, 1959; JOHNSTON et al., 2001; HAGMAN e KUHN, 2002; COGGAN et al., 2004; WESS et al., 2004; BARTOSKOVA et al., 2007).

Neste experimento houve uma correlação positiva entre as bactérias isoladas do conteúdo uterino das cadelas com piometra, com as bactérias isoladas na urina destes mesmos animais, reforçando a hipótese de que a infecção uterina e vesical podem ter a mesma origem. A bactéria isolada com maior frequência neste estudo foi a *E. coli*, isolada em 64,51% das amostras. Esses dados corroboram com a literatura existente (FRANSON e RAGLI, 2003; WESS et al., 2004; BARTOSKOVA et al., 2007; VERSTEGEN et al., 2008). A *E. coli* adere especificamente a sítios de ligação no endométrio previamente sensibilizados pela progesterona através de genes associados a fatores de virulência uropatogênicos. Esses genes têm sido notificados no homem aumentando a patogenicidade da *E. coli* por facilitar sua aderência ao epitélio (VERSTEGEN et al., 2008).

As culturas que apresentaram crescimento bacteriano foram submetidas ao antibiograma, com a intenção de traçar um perfil de resistência aos antibióticos mais comumente utilizados reforçando a hipótese de que a mesma bactéria é causadora de infecção uterina e cistite. A correlação do perfil de sensibilidade aos antibióticos também foi positiva quando comparamos as bactérias isoladas no conteúdo uterino e as isoladas na urina.

Não foi observada diferença nos resultados das culturas e dos antibiogramas quando comparamos os grupos piometra aberta e fechada. O relaxamento cervical nas cadelas é associado com a fase de proestro e estro, provavelmente, a contaminação

bacteriana do útero ocorre durante essas fases do ciclo estral, não havendo, portanto, diferença entre a piometra aberta e fechada em relação à contaminação bacteriana.

As bactérias foram mais sensíveis aos antibióticos doxiciclina (84,6% de sensibilidade) amoxicilina associada a ácido clavulânico (77% de sensibilidade), sulfa associada à trimetoprim (77% de sensibilidade) e enrofloxacin (66,6% de sensibilidade) e mais resistentes aos antibióticos cefalotina (77% de resistência) e ampicilina (53,8% de resistência). O trabalho realizado por Siqueira et al (2008) com linhagens de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra diagnosticadas no mesmo setor de Reprodução Animal obteve sensibilidade maior a norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin e o maior índice de resistência foi observado com o uso de sulfa associada à trimetopina. Essa diferença na resistência aos antibióticos obtida entre os trabalhos pode ser devido ao fato de que Siqueira et al (2008) trabalharam exclusivamente com *E. coli* e, em nossas amostras, aproximadamente 35% eram constituídas de outras bactérias. Esses resultados se revestem de importância, pois norteiam a terapia antibiótica utilizada no setor de Reprodução de Pequenos Animais da FMVZ- UNESP/Botucatu.

Lara et al (2008), investigaram o perfil de sensibilidade de 538 cadelas ao testarem 15 linhagens de *E. coli* isolada do trato urinário e útero de cadelas com piometra e observaram resistência para ampicilina, cefalexina, gentamicina, fluorquinolonas. Sanchez et al. (2002) ao estudarem 21 linhagens de *E. coli* isoladas de urina de cães verificaram resistência para sulfonamidas, tetraciclina, cefalosporinas e gentamicina.

Em nossa região um grande número de cães é acometido por hemoparasitose e o fato da doxiciclina apresentar uma sensibilidade grande às bactérias isoladas do conteúdo uterino é providencial, pois podemos utilizá-la como terapia de escolha para um tratamento concomitante de piometra e *erlichiose* canina. A utilização de antibióticos deve ser sempre cuidadosa, pois a taxa de resistência aos antibióticos pode estar relacionada ao uso indiscriminado e indevido dos antimicrobianos como subdoses, superdoses e descontinuidade da terapia. Esses atos podem aumentar a pressão seletiva para linhagens bacterianas multirresistentes em cães e gatos.

A presença de linhagens de *E. coli* multirresistentes aos antimicrobianos em animais de companhia é um alerta para os riscos em saúde pública, em virtude da

provável transmissão de bactérias dos animais para o homem, em face do estreito contato entre essas espécies (SIQUEIRA et al., 2008).

Uma das hipóteses aventadas quando do início dessa pesquisa era que animais portadores de piometra aberta apresentariam níveis mais baixos de progesterona e/ou imunomarcações diferentes de receptores de estrógenos e progesterona no útero ou na cérvix. O mecanismo de controle da abertura/fechamento da cérvix ainda é desconhecido. Weiss et al (2004) ao analisarem os resultados de progesterona (P4), observaram uma diferença significativa entre a piometra aberta e fechada, sendo de $4,8 \pm 0,9$ ng/mL os valores de P4 para a piometra aberta e de $13,2 \pm 5,5$ ng/mL para a piometra fechada. Em nosso experimento não houve diferença significativa entre as concentrações de P4 quando os grupos de piometra aberta e fechada foram comparados. Foi observada uma variação individual na dosagem plasmática de progesterona, sendo a menor concentração de 0,54 ng/ml e a maior de 35,43 ng/mL. Essa variação é esperada uma vez que o diagnóstico da piometra geralmente ocorre no diestro, mas pode também ser realizado no anestro, existindo uma variação normal na concentração da progesterona durante o ciclo estral canino. O baixo coeficiente de variação intraensaio (0,99) relacionado a dosagem de progesterona sinalizam que os testes foram realizados de forma adequada.

As cadelas com piometra aberta apresentaram concentrações superiores (8,2 ng/mL) de progesterona plasmática quando comparado com o grupo de fêmeas com piometra fechada (média de 5,6 ng/mL). Esses valores indicam níveis de P4 condizente com a fase de diestro e excluem a P4 como o fator responsável pelo mecanismo de abertura/fechamento cervical em cadelas com piometra.

Estudos sobre receptores hormonais em útero de cadelas já foram realizados. Segundo Kunkitti et al (2011), os receptores de estrógeno e progesterona controlam a abertura e fechamento cervical durante o ciclo estral, infelizmente o mecanismo envolvido, as mudanças e associações bioquímicas que ocorrem nesse processo não é totalmente conhecido.

Neste experimento foram realizados exames imunoistoquímicos para a identificação e quantificação dos receptores de estrógeno α (RE α) e β (RE β), receptores de progesterona (RP) e colágenos I e III em diferentes regiões do útero e da cérvix.

A avaliação imunoistoquímica empregada nesse trabalho foi capaz de marcar os núcleos das células que possuíam receptores. Por ser uma técnica semiquantitativa, a

presença e a intensidade da marcação refletem, respectivamente, a positividade da célula e a concentração destes receptores. As duas variáveis podem ser utilizadas, em alguns trabalhos os autores avaliaram o número de núcleos positivos e sua intensidade (BOOS et al., 1996; MARTIM et al., 2008; MARTIN, 2009), em outros trabalhos os pesquisadores avaliaram apenas a intensidade da marcação (ROBINSON et al., 2001) ou ainda em outros experimentos apenas a identificação foi realizada (BREEVELD-DWARKASING et al., 2002). Neste estudo optou-se pela realização das duas avaliações.

A concentração dos RE α não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados. A identificação e a quantificação de RE α também não apresentaram diferenças em nenhuma das regiões avaliadas no útero e cérvix quando comparamos os grupos de piometra aberta e fechada.

A avaliação imunoistoquímica dos RE β não apresentou diferença significativa quando avaliamos o número de núcleos positivos e a intensidade de marcação entre os grupos piometra aberta e fechada e nem entre as diferentes regiões do útero e da cérvix.

A expressão dos receptores de estrógeno e progesterona no endométrio é regulada pelos hormônios esteróides (estrógeno e progesterona) e, portanto, a resposta uterina ao estrógeno ou a progesterona circulante é mediada pelos seus respectivos receptores. Alterações ou desvios nos receptores uterinos têm sido especulados como fatores importantes na patogênese da Hiperplasia Cística do Endométrio/Piometra (HCE/P) em cadelas, mas nenhuma pesquisa foi realizada nesse sentido com o intuito de diferenciar a piometra fechada da aberta.

Um aumento nas concentrações de estrógenos plasmáticos provoca um aumento no número dos receptores de estrógenos (REs) e dos receptores de progesterona (RPs), enquanto uma diminuição nas concentrações desses receptores está relacionada com um aumento nos níveis plasmáticos de progesterona (GALABOVA-KOVACS et al., 2004). Enquanto nos animais normais há uma diminuição nos REs sob a influência de P4, esse mecanismo parece ser falho nas cadelas com HCE/piometra (DE COCK et al., 1997)

No final do estágio secretório (diestro) e início do anestro, o endométrio das cadelas com HEC/piometra tem uma quantidade significativamente maior de REs do que o observado no útero de fêmeas normais. Essa observação foi mais evidente nas glândulas basais do endométrio. Como resultado desse aumento dos REs, o endométrio permanece receptivo, mesmo com baixos níveis de estrógeno (E2) circulante. Isto pode

manter a proliferação das glândulas endometriais durante o estágio do ciclo estral, quando há uma forte influência de P4. Essa ação prolongada do E2 e da P4 pode explicar as modificações proliferativas císticas que caracterizam essa doença (VERVERIDIS et al., 2004).

Ainda de acordo com o trabalho realizado por De Cock et al (1997), a concentração de RE variou durante o ciclo estral com um escore mais alto no início da fase proliferativa (Diestro) e um escore mais baixo na fase secretória do ciclo estral. Esses resultados são similares com o observado em outros animais e no útero da mulher. Nesta pesquisa trabalhou-se com cadelas na maioria em fase de diestro e algumas em anestro não sendo possível a comparação com os resultados de De Cock et al (1997).

Quando se comparou a imunorreatividade dos RE α entre as diferentes regiões do útero observou-se que o epitélio glandular foi corado com uma intensidade mais forte do que o estroma, determinando uma concentração maior de RE α nessa região. Também na cérvix o epitélio glandular foi corado mais intensamente quando comparado com o estroma e o epitélio luminal. Levando em consideração que a concentração de receptores é diretamente proporcional a intensidade da marcação, a região com o maior número de RE α no útero e cérvix é o epitélio glandular. Esses resultados são contrários aos observados por Dhaliwal et al (1999) que encontraram um escore muito baixo para RE e RP no epitélio glandular do útero.

Em relação à identificação dos RPs não houve diferença significativa entre os grupos de piometra aberta e fechada, entretanto, houve diferença significativa na concentração de RPs entre os grupos piometra aberta e fechada quando se considerou as diversas regiões do útero. A imunoreatividade foi maior no epitélio glandular do útero, nas piometras fechadas. Em geral é aceito que os E2 induzem a proliferação das glândulas endometriais e que a P4 induz ao aumento da atividade secretora das glândulas endometriais, sendo também responsável pelo início da fase secretória. Neste contexto podemos inferir que a produção de muco é maior nas piometras fechadas, uma vez que as concentrações de RPs são maiores no epitélio glandular da condição fechada.

De acordo com Galabova-Kovacs et al (2004) existe uma relação inversa entre os níveis de progesterona plasmática e as concentrações de RPs. Se considerarmos nossos resultados, os valores de progesterona foram maiores (8,2 ng/mL) nas piometras abertas e, portanto seria esperada uma concentração menor de RPs, o que concorda com o autor acima mencionado e com a imunorreatividade observada em nossa pesquisa.

Receptores de P4 são menos expressos em cadelas com HEC/piometra, se comparadas às fêmeas controles durante todo o diestro. A ação de P4 normalmente reduz o número de RPs, portanto, RPs em menor número que o normal indica uma forte ação de P4 (a despeito de uma concentração normalmente alta de P4 no diestro) e uma intensa ativação de RPs em cadelas com HEC/piometra no diestro. Escores imunoistoquímicos de RPs nuclear nas várias camadas do útero com HEC/piometra, durante o diestro foram baixos de acordo com Dhaliwal et al (1999). Concluiu-se neste estudo, que há uma sensibilidade aumentada à ação de P4, pois altos níveis de P4 parecem ativar os RPs no útero, provocando uma intensa diminuição na expressão e supressão do REs.

Não foi observada diferença nas concentrações de RPs entre a piometra aberta e fechada na cérvix, entretanto, a intensidade de marcação dos RPs foram mais forte no estroma quando comparadas com as intensidades mais fracas dos epitélios glandular e luminal. Portanto, existe um maior número de RPs no estroma quando comparada as outras regiões da cérvix.

Nossos resultados estão de acordo com os achados de Kunkitti et al (2011) onde não foi verificado diferença significativa entre as cadelas com piometra aberta e piometra fechada utilizando como variáveis o número de núcleos positivos para receptores de estrógenos e progesteronas.

Diversos autores como De Cock et al (1997), De Bosschere et al (2002a), De Bosschere et al (2002b), De Bosschere et al (2003) e Ververidis et al (2004) estudaram os receptores de estrógeno e progesterona no útero de cadelas normais e com HCE/piometra. Os resultados demonstraram uma diferença importante entre o número de RE e RP em cadelas com HCE e cadelas com piometra. As diferenças na expressão desses receptores sugerem fatores distintos na patogênese da HCE e da piometra. Esses autores, entretanto, não consideraram as diferenças dos receptores hormonais no mecanismo de abertura ou fechamento da cérvix.

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

passagem de microorganismos e de espermatozóides para dentro da cavidade uterina (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

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

De acordo com Chatdarong et al (2010) uma grande proporção de colágenos na cérvix de cadelas cíclicas é provavelmente associada como um aumento de estradiol durante o estro provocando uma diminuição na tensão causando relaxamento cervical. Resultados semelhantes são observados em cadelas com piometra aberta, sugerindo que a abertura da cérvix é associada com o aumento na proporção de colágenos e fibras musculares.

Analizou-se neste estudo as proporções de colágenos I e III no útero e cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada e não foram verificadas diferenças significativas entre as duas condições e nem entre os diversos tecidos investigados. Nossos resultados demonstraram apenas que não houve diferença na proporção de colágenos entre a piometra aberta e a fechada, mas as proporções entre os diversos tecidos constituintes da cérvix não foram efetuados. Também um aumento nas concentrações de colágenos não foram identificados na piometra fechada.

As hipóteses inicialmente aventadas para explicar os mecanismos de abertura e fechamento cervical não se concretizaram, ou seja, a identificação e as concentrações de receptores de estrógenos α e β , receptores de progesterona e colágenos I e III não estão implicados nos mecanismos de relaxamento cervical. Novos estudos são necessários abordando ainda aspectos imunoistoquímicos talvez envolvendo os receptores de prostaglandinas F2 α ou E2. Avaliações das proporções de colágeno e fibras musculares conforme o considerado por Chatdarong et al (2010) talvez seja uma opção para o estudo da abertura cervical, bem como o exame histológico comparativo da cérvix durante o trabalho de parto.

A piometra é uma doença frequente nas cadelas e a despeito de décadas de pesquisa ainda são necessários estudos utilizando ferramentas mais sofisticadas e grupos de animais em fases hormonais bem definidas.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Com base nos objetivos propostos podemos concluir que:

- Os receptores de estrógeno α e β , colágenos I e III comportaram-se da mesma maneira na piometra aberta e fechada, não estando envolvidos nos mecanismos de abertura e fechamento cervical.
- As concentrações de receptores de progesterona foram superiores nas piometras fechadas.
- As concentrações de progesterona plasmática foram semelhantes nas piometras abertas e fechadas.
- O hemograma das cadelas com piometra aberta e fechada foram semelhantes e característicos de um processo inflamatório crônico. A função renal dos animais comprometidos estão dentro dos limites considerados normais para espécie canina.
- Houve uma correlação positiva entre as bactérias isoladas do conteúdo uterino e vesícula urinária. A bactéria mais frequentemente isolada foi a *E. coli* e o antibiótico mais sensível foi a doxiciclina.
- Nossa amostra experimental constituiu-se de cadelas adultas, nulíparas, sem histórico de pseudogestação e hormonioterapia.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resistência microbiana - mecanismos e impacto clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/laboratorio2.htm

ANGULO, S.M. Clinical aspects of uterine disease in the bitch anqueen. Procceding of the SEVC – Southern European Veterinary Conference. Barcelona, 2009. Disponível em www.ivis.org.

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, p.1530-6, 2006

BARROS, N. U. M.; SILVA, U. R. C. F.; STELLING, W.; VILAR, T. D.; MORAES, G. J. A. Achados sanguíneos em cadelas com piometra aberta. **Revista da Universidade Rural. Série Ciências da Vida**, v. 25, supl.p.143-144, 2005.

BARTOSKOVA, A.; ADLEROVA, L.; KUDLACKOVA, H.; LEVA, L.; VITASEK, R.; FALDYNA, M. Lactoferrin in Canine Sera: A Pyometra Study. **Reproduction Domestic Animal** v.44, p.193-5, 2009.

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

BIGLIARDI, E.; PARMIGIANI, E.; CAVIRANI, S.; LUPPI, A.; BONATI, L.; CORRADI, A. Ultrasonography and cystic hyperplasia–pyometra Complex in the Bitch. **Reproduction Domestic Animal** v.39, p.136–40, 2004.

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

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

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

CANÇADO, R.D.; CHIATTONE, C.S. Anemia de Doença Crônica – Revisão. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.24, n.2, p.127-36, 2002.

CARTER, M.E. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994, 648p

CARVALHO, C.C.D.; REGO, E.W.; QUEQUE, M.; SOARES, P.C. Avaliação da proteína C reativa, fibrinogênio e leucograma em cadelas com e sem piometra. **Medicina Veterinária Recife** v.2, n.2, p.1-8, 2008.

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

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

COGGAN, J.A.; OLIVEIRA, C.M.; FAUSTINO, M.; MORENO A.M.; VON SYDOW, A.C.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R. Microbiological study of intrauterine secretion from bitches with pyometra and research of virulence factors of *Escherichia coli* isolates. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.71, p.1-749, 2004.

COGGAN, J.A.; MELVILLE, P.A.; OLIVEIRA, C.M.; FAUSTINO, M.; MORENO, A.M.; BENITES, N.R. Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.39, p.477-83, 2008.

DABROWSKI, R.; WAWRON, W.; KOSTRO, K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. **Theriogenology** v.67, p.321-7, 2007.

DABROWSKI, R.; KOSTRO, K.; LISIECKA, U.; SZCZUBIAL, M.; KRAKOWSKI, L. Usefulness of C-reactive protein, serum A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. **Theriogenology** v.72, p.471-6, 2009.

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

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

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; TSHAMALA, M. Uterine Oestrogen and Progesterone Receptor Expression in Experimental Pyometra in the Bitch. **Journal Comparative Pathology** v.128, p.99-106, 2003.

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

DECLERCQ, J. Suspected toxic shock-like syndrome in a dog with closed-cervix pyometra. **The Author Journal Compilation** v.18, p.41-4, 2007.

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

DEMIREL, M.A.; KUPLULU, S. Investigations on the Antidotoxic Effect of the Combination of Polymyxin E and Ampicilina in Dogs with Endotoxic Pyometra. **Kafkas Universitese Veteriner Fakultesi Dergisi** v.16, n.2, 313-8, 2010.

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

DOW, C. Experimental reproduction of the cystic hiperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal Pathology Bacteriology** v. 78, p. 267-278, 1959.

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

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

FERREIRA, C.R.; LOPES, M.D. Complexo- hiperplasia cística endometrial/piometra em cadelas- revisão. **Revista Clínica Veterinária**, n.25, p.36-44, 2000.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5.ed. Philadelphia : Willians & Wilkins, 2000. 1344p.

FELDMAN, E.C. O complexo hiperplasia endometrial cística/piometra e infertilidade em cadelas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária – doenças do cão e do gato**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. v.2, p.1632-69, 2004.

FRANSSON, B.A.; KARLSTAM, E.; BERGSTROM, A.; LAGERSTEDT, A.S.; PARK, J.S.; VANS, M.A.; RAGLE, C.A. C-reactive Protein in the Differentiation of Pyometra From Cystic Endometrial Hyperplasia/Mucometra in Dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association** v.40, p.391-9, 2004.

FRANSSON, B.A.; LAGERSTEDT, S.A.; BERGSTROM, A.; HAGMAM, R.; PARK, S.J.; CHEW, B.P.; EVANS, M.A.; RAGLE, C.A. C-reactive protein, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care** v.10, p.4431, 2006.

FRANSSON, B.A.; RAGLE, C.A. Canine Piometra: An Update on Pathogenesis and Treatment. **Compendium Small Animal Exotics**. v.25, n.8, p.602-12, 2003.

GALABOVA-KOVACS, G., WALTER, I., AURICH, C., AURICH, J.E. Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro conditions. **Theriogenology**, v. 61, p. 963-76, 2004.

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

HAGMAN, R.; LAGERSTEDT, A.S.; HEDHANMAR, A.; EGENVALL, A. A breed-matched case-control study of potential risk-factors of canine pyometra. **Theriogenology** v.75, p.1251-7, 2011.

HAGMAN, R.; KINDAHL, H.; FRANSSON, B.A.; BERGSTROMMA, A.; STROMHOLST, B.; LAGERSTEDT, A.S. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2a metabolite analysis. **Theriogenology** v.66, p.198-206, 2006.

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

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

HEIENE, R.; KRISTIANSEN, V.; TEIGE, J.; JASEN, J.H. Renal histomorphology in dogs with pyometra and control dogs, and long term clinical outcome with respect to signs of kidney disease. **Acta Veterinaria Scandinavica** v.19, n.1, 2007.

KIDA, K.; BABA, E.; TORII, R.; KAWATE, N.; HATOYA, S.; WIJEWARDANA, V.; SUGIURA, K.; SAWADA, T.; TAMADA, H.; INABA, T. Lactoferrin expression in the canine uterus during the estrous cycle and with pyometra. **Theriogenology** v.66, p.1325-33, 2006.

KIDA, K.; MAEZONO, Y.; KAWATE, N.; INABA, T.; HATOYA, S.; TAMARA, H. Epidermal growth factor, transforming growth factor- α , and epidermal growth factor receptor expression and localization in the canine endometrium during the estrous cycle and in bitches with pyometra. **Theriogenology** v.73, p.36-47, 2010.

KONEMAM, E.W. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica LTDA, 2001 a, cap. 3, p.125-67.

KONEMAM, E.W. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica LTDA, 2001 b, cap. 15, p.794-853.

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

KUPLULU, S.; VURAL, M.R.; DEMIREL, A.; POLAT, M.; AKÇAY, A. The comparative evaluation of serum biochemical, haematological, bacteriological and clinical findings of dead and recovered bitches with pyometra in the postoperative process. **Acta Veterinaria (Beograd)** v.59, n.2-3, p.193-204, 2009.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline theriogenology**. 1. ed. Phyladelphia: WB Saunders Company, 2001, p. 206-224.

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

LARA, V.M.; DONADELI, F.S.F.; CRUZ, A.B. Multirresistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de cadelas com piometra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, p.1032-1034, 2008.

MARCEU, R.H.; LOPES, M.D.; KANEKO, C.M.; VOLPATO, R. Levantamento retrospectivo dos diagnósticos de piometra associados a erlichiose canina. Congresso de **Iniciação Científica, Campus Botucatu**, 2010.

MARTINS, D.G. **Complexo hiperplasia endometrial cística/piometra em cadelas: fisiopatogenia, características clínicas, laboratoriais e abordagem terapêutica**. Jaboticabal, 2007. Dissertação (mestrado) Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, câmpus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista.

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

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

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. (Eds). **Small animal internal medicine**. 3.ed. St. Louis: Mosby, 2003. 1362p.

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

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

PRESTES, N. C.; LOPES, M. D.; BICUDO, S. D.; OBA, E.; VULCANO, L. C.; LANGONI, H.; KOHAYAGAWA, A. Piometra canina: aspectos clínicos, laboratoriais e radiológicos. **Semina**, v.12, p. 53-56, 1991.

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

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

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

SANCHEZ, S.; STEVENSON, M.A.A.; HUDSON, C.R. Characterization of multidrug resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. **Journal Clinical Microbiology**, v.40, p.3586-95, 2002.

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

SCHLAFFER, D.H.; GIFFORD, A.H. Cystic endometrial hyperplasia, pseudoplasentation endometrial hyperplasia and other cystic conditions of the canine in feline uterus. **Theriogenology**. v.70, p.349-58, 2008

SILVA, E.; LEITÃO, S.; FERREIRA-DIAS, G.; LOPES DA COSTA, L.; MATEUS, L. Prostaglandin Synthesis Genes are Differentially Transcribed in Normal and Pyometra Endometria of Bitches. **Reproduction Domestic Animal** v.44, n.2, p.200-3, 2009.

SIQUEIRA, A.K.; RIBEIRO, M.G.; LEITE, D.S.; TIBA, M.R.; MOURA, C.; LOPES, M.D.; PRESTES, N.C.; SALERNO, T.; SILVA, A.V. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. **Research in Veterinary Science** v.86, p.206-10, 2009.

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

STOCKHAM, S.L. Hematologic changes due to bacterial infections. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia : Williams & Wilkins, 2000. Cap. 7, p.38-43.

SYDOW, A.C.M.D.G.V. **Avaliação de ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes**. São Paulo, 2005. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus São Paulo, Universidade de São Paulo.

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

VERMEIRSCH, H., SIMOENS, P., LAUWERS, H., CORYN, M. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 51, p. 729-43, 1999.

VERMEIRSCH, H., SIMOENS, P., HELLEMANS, M., CORYN, M., LAUWERS, H. Immunohistochemical detection of progesterone receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 53, p. 773-88, 2000.

VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, K.; VERSTEGEN-ONCLIN. Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: Advances in treatment and assessment of future reproductive success. **Theriogenology**, v.70, p.364-74, 2008.

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

VOLPATO, R.; CURTI, F.; PEREIRA, R.S.; MOMESSOC.A.S.; MARTINS, E.A.; CRUVINEL, T.M.A.; SOUSA, D.B. Caracterização Microbiológica do conteúdo uterino e vesical de cadelas com piometra atendidas no Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” – Resultado Preliminar. **Anais do V Congresso Científico da UNIRP**, 2008.

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

WHEATON, L.G.; JOHNSON, A.L.; PARKER, A.J.; KNELLER, S.K. Results and complications of surgical treatment of pyometra: a review of 80 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.25, p.563-8, 1989.

Trabalho Científico

Trabalho escrito nas normais a ser enviado para o Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935(impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins. Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os trabalhos cujos textos necessitem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista.

Reprodução de artigos publicados: A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Artigo científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa. Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos. **Autores.** Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail. **Resumo e Abstract.** Devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões. **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco. **Introdução.** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho. **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança. **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados. **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto. **Conclusões.** As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada. **Ilustrações.** São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final. **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. **Figura.** Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg. **Referências bibliográficas.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas **Citações bibliográficas** Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto

AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE ÚTERO E CÉRVIX DE CADELAS COM
O DIAGNÓSTICO DE PIOMETRA

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF THE CERVIX AND UTERUS OF
BITCHES DIAGNOSED WITH PYOMETRA

Volpato, R.; Martin, I.; Tsunemi, M.H.; Laufer-Amorin, R.; Lopes, M.D.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP-Botucatu)

Alameda dos Jacarandás, 45. Cond. Portal de Itu. Itu-SP CEP: 13301-612

(11) 96739219 (14) 88178385 email: rodrigo.volpato@hotmail.com

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi analisar de forma comparativa piometra de cérvix aberta e fechada a fim de compreender o mecanismo de abertura e fechamento cervical. Para tanto, foram utilizadas 31 cadelas, de raças e idades variadas, sendo 25 cadelas com piometra de cérvix aberta e 6 de cérvix fechada. Após ovariosalpingohisterectomia (OSH), foram coletados fragmentos da cérvix e do útero para a avaliação imunoistoquímica. Foram analisados os receptores de estrógenos α e β , progesterona e colágeno I e III. Foram realizadas imunomarcações em diferentes regiões da cérvix como o epitélio glandular, epitélio luminal e estroma glandular, assim como em diferentes regiões do útero como epitélio glandular e estroma glandular. As imunomarcações de colágeno I e III foram realizadas nas regiões glandular e muscular da cérvix e útero. Os resultados foram avaliados através de testes estatísticos adequados entre os grupos piometra aberta e fechada e entre as regiões teciduais. Os receptores de estrógeno α e β , colágenos I e III comportaram-se da mesma maneira na piometra aberta e fechada. As concentrações de receptores de progesterona foram superiores nas piometras fechadas. Novos estudos são necessários para compreender o mecanismo de controle da abertura e fechamento cervical.

Palavras-chave: cadela, piometra, imunoistoquímica

34 **ABSTRACT**

35 The aim of this study was to analyze comparatively open and closed cervix pyometra in
 36 order to understand the mechanism of cervical opening and closing. To this end, we used
 37 31 bitches of different breeds and ages, 25 with pyometra cervix open and 6 closed
 38 cervix. After ovariohysterectomy (OSH) the procedure, samples were collected from the
 39 cervix and uterus to evaluate immunohistochemistry. For immunohistochemical
 40 evaluation were analyzed estrogen receptors α and β , progesterone and collagen I and
 41 III. Immunostainings were performed in different regions of the cervix such as
 42 glandular epithelium, luminal epithelium and glandular stroma, as well as in different
 43 regions of the uterus as glandular epithelium and glandular stroma. The
 44 immunostainings for collagen I and III were performed in muscular and glandular
 45 regions of the cervix and uterus. The results between open and closed piometra were
 46 evaluate trough statistical test. The estrogen receptors α and β , collagen I and III
 47 behaved the same way in both open and closed pyometra. Concentrations of
 48 progesterone receptors were higher in closed pyometra Further studies are needed to
 49 understand the mechanism controlling the cervical opening and closing.

50 **Keywords:** bitches, pyometra, immunohistochemistry

52 **INTRODUÇÃO**

53 A piometra é uma enfermidade da cadela adulta caracterizada pela inflamação
 54 do útero com acúmulo de exsudato, que ocorre na fase lútea do ciclo estral, de quatro
 55 semanas a quatro meses após o estro (COGGAN et al., 2004; SMITH, 2006). No diestro
 56 ocorre uma hipertrofia/hiperplasia do endométrio, estimulado pela progesterona e,
 57 subsequentemente uma invasão bacteriana (WEISS et al., 2004). Trata-se de uma das
 58 enfermidades mais comuns que ocorre no trato genital das fêmeas caninas (COGGAN
 59 et al., 2004; PRETZER, 2008; GOERICKE-PESCH et al., 2010).

60 É conhecido que algumas raças como Rottweiler, Collie, Golden Retriever,
 61 Labrador Retriever e Pastor Alemão tem uma maior incidência de piometra. Segundo
 62 Hagman et al (2011) os fatores de risco para a doença podem variar entre as raças e a
 63 gestação é considerada um fator protetor contra a piometra, com exceção para a raça
 64 Golden Retriever onde a nuliparidade pode não ter interferência.

65 A patogênese da piometra canina não é completamente esclarecida, a despeito de
 66 décadas de estudo a respeito da etiologia desta doença. O conceito de Síndrome

67 Hiperplasica Endometrial Cística/Piometra, introduzido por Dow (1957; 1958), sugere
68 que mudanças hormonais provocam a hiperplasia endometrial cística (HEC) e tornam o
69 útero mais susceptível a infecção secundária. Dow (1958) e Sandholm et al., (1975)
70 propuseram que uma endometrite sub-aguda é seguida pela HEC, a qual predispõe a
71 piometra. Mais recentemente, De Bossechere et al (2001) sugeriram que devido as
72 diferenças clínicas e histopatológicas, a HEC e a piometra devem ser classificadas
73 separadamente. É comum a piometra ser definida como um complexo
74 endometrite/HEC/piometra (ARORA et al., 2006).

75 Há um consenso de que as lesões observadas na piometra são resultados de uma
76 interação hormonal e participação bacteriana. Apesar dos vários estudos sobre o tema,
77 clinicamente a síndrome piometra ainda representa um desafio para a maioria dos
78 profissionais, sendo difícil estabelecer um prognóstico preciso (DE COCK et al., 1997;
79 FERREIRA e LOPES, 2000; WEISS et al., 2004; MARTINS, 2007).

80 A piometra pode se apresentar de forma aberta ou fechada, caracterizada pela
81 presença ou ausência de corrimento vaginal, respectivamente. A cérvix é considerada
82 uma barreira física prevenindo a infecção ascendente pela secreção de muco e
83 constrição; a abertura ou fechamento da cérvix são ciclo dependente. Na mulher, a
84 dilatação cervical, durante o parto, correlaciona-se com a extensão do infiltrado de
85 neutrófilos, entretanto, os mecanismos de dilatação cervical nas cadelas não são
86 totalmente esclarecidos (CHATDARONG et al., 2008).

87 A piometra tem sido associada a repetidas e prolongadas respostas ao estrógeno
88 durante o estro, seguida por longos intervalos de dominância da progesterona levando a
89 mudanças no endométrio (SMITH, 2006; PRETZER, 2008). A estimulação
90 progesteronal resulta em proliferação do endométrio, secreção das glândulas uterinas e
91 diminuição das contrações do miométrio. A inibição leucocitária no útero sensibilizado
92 pela progesterona facilita a infecção bacteriana. O endométrio sob o estímulo da
93 progesterona se hipertrofia devido a um aumento no número e no tamanho de suas
94 glândulas, que aumentam suas atividades secretoras e um fluido estéril pode se
95 acumular no lúmen do útero. Essas respostas as ações hormonais podem ser mais
96 exacerbadas com o uso de progestágeno exógeno (DE BOSSCHERE et al., 2001;
97 RAGNI, 2005; PRETZ, 2008).

98 Sob a influência estrogênica, a cérvix se abre, o que permite a entrada de
99 bactérias da microbiota normal da vagina para o interior do lúmen uterino (OLIVEIRA,

2007; OLIVEIRA et al., 2008). A patência da cérvix é regulada pela musculatura lisa, tecido fibroso e elastina. A remodelação da matriz extracelular tem um papel importante na dilatação cervical pela degradação do colágeno. Em trabalho realizado por Chatdarong et al (2010) foi postulado que o útero de cadelas cíclicas tem uma maior proporção de colágeno comparado com a musculatura lisa, provavelmente associada ao aumento do estradiol durante o estro, isso leva a uma diminuição da resistência a tração, causando o relaxamento da cérvix. Resultado semelhante é observado nas cadelas com piometra de cérvix aberta, sugerindo que a abertura do colo uterino é associada a um aumento na proporção de colágenos frente a fibras musculares.

Pesquisas estão sendo focadas nas concentrações de receptores hormonais no endométrio e sua implicação no desenvolvimento da piometra. Anticorpos monoclonais para receptores de estrógenos humanos foram utilizados para detectar a presença de receptores de estrógeno no útero de cadelas normais e com HCE. Como resultado obteve-se uma diferença importante, um maior número de receptores em cadelas com HCE era esperado, já que os estrógenos são os responsáveis pela proliferação das glândulas do endométrio uterino (DE COCK et al., 1997; DE BOSSCHERE et al., 2002a; DE BOSSCHERE et al., 2003, VERVERIDIS et al., 2004).

De Bosschere et al (2002b) avaliaram, por ensaio imunoistoquímico, a expressão de receptores de estrógeno (ER) e receptores de progesterona (PR) no útero de cadelas normais, com piometra e com HEC. As contagens de ER e PR foram mais elevadas nos animais com HEC quando comparados ao útero de cadelas normais ou portadoras de piometra, sendo que a menor contagem foi verificada em cadelas com piometra. As diferenças na expressão de receptores sugerem fatores distintos na patogênese de ambas entidades. Assim, pode-se pensar que a piometra é desencadeada por uma cascata de eventos iniciada pela infecção bacteriana.

Em consequência da expressão significativamente aumentada do ER em cadelas com HEC, o endométrio permanece receptivo ao hormônio mesmo com níveis baixos de estrógeno circulante. Isto pode esclarecer a continua proliferação das glândulas endometriais durante o estágio de forte influência da progesterona. A ação prolongada simultânea do estrógeno e da progesterona poderia explicar as mudanças na proliferação cística que são características da piometra (DE COCK et al., 1997).

A piometra canina é provavelmente a doença mais severa do útero de cadelas, sendo responsável por um índice elevado de mortalidade quando não diagnosticada

133 precocemente. Apesar dos vários estudos sobre o tema, a piometra ainda representa um
134 desafio para a maioria dos profissionais, sendo difícil estabelecer um prognóstico
135 precoce e seguro, portanto o objetivo dessa proposta é a avaliação imunoistoquímica
136 dos receptores de estrógeno α , estrógeno β , progesterona, colágeno I e colágeno III da
137 cérvix e endométrio canino numa tentativa de estabelecer o mecanismo relacionado a
138 abertura/fechamento da cérvix

139

140 MATERIAL E MÉTODOS

141 A pesquisa em questão atendeu aos requisitos impostos pela Comissão de Ética
142 no uso de animais de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da
143 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus Botucatu,
144 recebendo o protocolo número 26/2009 – CEEA.

145 Foram utilizadas 31 cadelas com diagnóstico de piometra atendidas na área de
146 Reprodução de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e
147 Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP
148 campus Botucatu. Do total de cadelas, 25, caracterizada pela presença de secreção
149 vaginal purulenta, mucopurulenta ou sanguinolenta e 6 apresentavam piometra de
150 cérvix de fechada. Após o procedimento da OSH foram coletados fragmentos da cérvix
151 e do útero para a avaliação imunoistoquímica dos receptores de progesterona, estrógeno
152 α e β e colágenos I e III

153 Os fragmentos uterinos e cervicais foram fixados em formol tamponado 10%
154 durante 24 horas e, posteriormente, mantidos em álcool 70% até o momento de inclusão
155 em parafina, realizada no Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia
156 Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu.
157 Após a inclusão, cortes de 3 μ m foram obtidos, montados em lâminas com extremidade
158 fosca e corados inicialmente em HE para avaliar a qualidade do material.
159 Posteriormente novos cortes de 3 μ m foram realizados e colocados em lâminas com
160 extremidade fosca, previamente tratadas com Poly-L-lysina (Poly-L-lysine® – Sigma
161 Chemical Co.- USA).

162 Para a desparafinização do material emblocado, as lâminas foram mantidas em
163 estufa a 55°C por 24 horas e, posteriormente, colocadas em cuba de vidro com xilol à
164 temperatura ambiente por 30 minutos e, a seguir mantidas em uma nova solução de xilol
165 por 20 minutos. As lâminas foram transferidas para cubas de vidro para a hidratação em

166 banhos de álcool, permanecendo por três minutos em cada cuba (álcool absoluto I, II,
167 III, álcool 95% e 85%).

168 Posteriormente as lâminas foram submetidas a dez passagens de água destilada.
169 A partir desta etapa o tratamento se difere para cada antígeno pesquisado.

170 Para a detecção de receptores de estrógeno α realizou-se a recuperação
171 antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM (1000 mL de água destilada e 2,1 g de
172 ácido cítrico monohidratado, com o pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com
173 incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako-USA). A etapa seguinte foi o
174 bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos (2
175 banhos de 10 minutos cada), 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite mólico
176 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em
177 solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base®-Sigma Chemical Co-USA). Realizou-se a
178 incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:50, para os receptores de
179 estrógeno alfa (anticorpo Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor α clone
180 1D5 - Dako - CA, USA. Cód M7047.), em câmara úmida durante 18h à temperatura de
181 4°C.

182 Para a detecção de receptores de estrógeno β realizou se a recuperação
183 antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM com incubação em microondas,
184 potência máxima - 750W, durante 15 minutos (três ciclos de cinco minutos cada). A
185 etapa seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada
186 8% por 20 minutos (2 banhos de 10 minutos cada), 10 lavagens em água destilada,
187 bloqueio com leite mólico 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água
188 destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4. Realizou-se a incubação com o
189 anticorpo primário, na diluição de 1:100, para os de estrógeno β (anticorpo Monoclonal
190 Mouse Anti-Human Estrogen β clone PPG5/10, Dako, USA. Cód. M7292), em câmara
191 úmida durante 18h à temperatura de 4°C.

192 Para a detecção de receptores de progesterona realizou se a recuperação
193 antigênica em solução de citrato de sódio 10 mM com incubação em panela de pressão
194 tipo pascal (Dako-USA). A etapa seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena em
195 solução de água oxigenada 8% por 20 minutos (2 banhos de 10 minutos cada), 10
196 lavagens em água destilada, bloqueio com leite mólico 3g/100mL por 60 minutos
197 seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4.
198 Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:50, para os

receptores de progesterona (anticorpo monoclonal cat. No 1546, Immunotech, France), em câmara úmida durante 18h à temperatura de 4°C.

Para a detecção de colágeno I e III realizou recuperação antigênica em pepsina 1% pH 1,8 (Pepsina 1:1000 NF- Nuclear SP-Brasil) com incubação em estufa a 60°C por 10 minutos e em seguida estufa a 37° por 20 minutos. A etapa seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos (2 banhos de 10 minutos cada), 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite mólico 3g/100mL por 60 minutos seguida de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4. Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:2000, para colágeno I e III (respectivamente Rabbit anti bovine col I IgA Novotec. Ref. 20121; Rabbit anti bovine col III IgA Novotec. Ref. 2930) em câmara úmida durante 18h à temperatura de 4°C.

As próximas etapas são semelhantes para todos os antígenos. Após as 18 horas de incubação com o anticorpo primário em câmara úmida a 4°C, o material foi então submetido a banhos de TRIS e, posteriormente, incubado com o anticorpo secundário Advance (Advance, Dako, USA) por 30 minutos cada etapa, ainda em câmara úmida, segundo instruções do fabricante. Realizou-se nova lavagem com solução tampão TRIS - pH 7,4, e revelação com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina - Liquid DAB Cromogen® – Dako – USA) durante 5 minutos ao abrigo da luz e novamente lavagem com solução tampão TRIS - pH 7,4.

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer por 30 segundos, e a coloração interrompida com lavagem em água corrente por 10 minutos e cinco passagens em água destilada. Procedeu-se, então, a desidratação do material com banhos de álcool, as lâminas permaneceram 3 minutos em cada cuba (álcool 85%, 95%, álcool absoluto I, II, III, xilol I e II) e por fim, as lâminas foram montadas com lamínulas utilizando-se resina sintética - Permount (Fisher Scientific – cód. UN1294e).

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

Depois de todas as lâminas confeccionadas e identificadas realizou-se a leitura.

232 Para os receptores de estrógenos α , estrógenos β e progesterona os tecidos
233 avaliados na cérvix foram o epitélio luminal, epitélio glandular e o estroma. No útero os
234 tecidos avaliados foram o epitélio glandular e o estroma. Todas as avaliações para o
235 útero e cérvix foram realizadas nestes tecidos. Para avaliar a imunomarcção foram
236 utilizados dois métodos, no primeiro, em cada um desses tecidos foram contados 300
237 núcleos, sendo considerados positivos aqueles corados em marrom e negativos aqueles
238 corados em azul. No segundo método a intensidade das marcações foram avaliadas de
239 forma subjetiva em fraca, moderada e forte. As avaliações foram realizadas em um
240 microscópio de luz no aumento 400 vezes.

241 Para o colágeno I e III a mesma forma de avaliação foi empregada para o útero e
242 a cérvix. Dois métodos foram utilizados para avaliar a imunomarcção, no primeiro, dez
243 campos aleatórios, nos tecidos muscular e estroma, eram observados em microscópio de
244 luz no aumento 100 vezes. Cada campo recebia escore de 1 (menos de 25% do campo
245 corado de marrom), 2 (26% a 50%), 3 (51% a 75%) ou 4 (acima de 75%). A média dos
246 campos foi realizada calculando o escore definitivo daquela lâmina. No segundo
247 método a intensidade foi classificada de forma subjetiva como fraco (menos de 20% das
248 fibras coradas), moderado (26% a 75%) e forte (acima de 76%).

249 Para comparar os resultados médios entre os grupos de piometra aberta e
250 piometra fechada utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney, pois há uma
251 grande diferença no tamanho amostral entre os grupos. A fim de detectar diferenças
252 significativas entre os grupos, os resultados foram avaliados considerando $p < 0,05$. A
253 frequência das intensidades dos núcleos positivos (fraco, moderado e forte) entre as
254 regiões teciduais estudadas foi comparada através do teste qui-quadrado/ exato do teste
255 de Fisher. Nos casos em que houve uma associação significativa, realizou-se a partição
256 da tabela qui-quadrado, onde se compara as frequências entre os locais estudados.

257

258 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

259 A piometra é uma enfermidade frequente em cadelas não castradas adultas ou
260 idosas e se não diagnosticada e tratada precocemente pode levar o animal a morte. A
261 despeito de décadas de pesquisa alguns pontos na patogenia da piometra ainda não são
262 completamente elucidado. Da mesma forma, os mecanismos envolvidos na abertura e
263 fechamento da cérvix não são conhecidos; as piometras abertas são menos tóxicas e
264 mais fáceis de serem tratadas e se os mecanismos de relaxamento cervical fossem

265 esclarecidos poderíamos no mínimo estimular a abertura cervical e induzir a eliminação
266 do conteúdo uterino. O objetivo desse estudo foi aumentar nosso entendimento sobre a
267 etiologia dessa doença principalmente no tocante a abertura e/ou fechamento cervical. A
268 piometra é uma doença diagnosticada principalmente na fase do diestro do ciclo estral e
269 mesmo com concentrações elevadas de progesterona característica dessa fase a maioria
270 dos casos de piometra são abertas.

271 Para a realização deste estudo trabalhamos com cadelas de idade variando de
272 três a 17 anos, média de 8,5 anos. Dessas fêmeas apenas três receberam hormônios
273 exógenos e a pseudogestação não foi referida por nenhum proprietário.

274 Estudos sobre receptores hormonais em útero de cadelas já foram realizados.
275 Segundo Kunkitti et al (2011) os receptores de estrógeno e progesterona controlam a
276 abertura e fechamento cervical durante o ciclo estral, infelizmente o mecanismo
277 envolvido, as mudanças e associações bioquímicas que ocorrem nesse processo não é
278 totalmente conhecido.

279 Neste experimento foram realizados exames imunoistoquímicos para a
280 identificação e quantificação dos receptores de estrógeno α (RE α) e β (RE β), receptores
281 de progesterona (RP) e colágenos I e III em diferentes regiões do útero e da cérvix.

282 A avaliação imunoistoquímica empregada nesse trabalho foi capaz de marcar os
283 núcleos das células que possuíam receptores. Por ser uma técnica semiquantitativa a
284 presença e a intensidade da marcação refletem, respectivamente, a positividade da
285 célula e a concentração destes receptores. As duas variáveis podem ser utilizadas; em
286 alguns trabalhos os autores avaliaram o número de núcleos positivos e sua intensidade
287 (BOOS et al., 1996; MARTIM et al., 2008; MARTIN, 2009), em outros trabalhos os
288 pesquisadores avaliaram apenas a intensidade da marcação (ROBINSON et al., 2001)
289 ou ainda em outros experimentos apenas a identificação foi realizada (BREEVELD-
290 DWARKASING et al., 2002). Neste estudo optou-se pela realização das duas
291 avaliações.

292 A concentração dos RE α não apresentou diferença significativa entre os grupos
293 estudados. A identificação e a quantificação de RE α também não apresentaram
294 diferenças em nenhuma das regiões avaliadas no útero e cérvix quando comparamos os
295 grupos de piometra aberta e fechada.

296 A avaliação imunoistoquímica dos RE β não apresentou diferença significativa
297 quando avaliamos o número de núcleos positivos e a intensidade de marcação entre os
298 grupos piometra aberta e fechada e nem entre as diferentes regiões do útero e da cérvix.

299 Um aumento nas concentrações de estrógenos plasmáticos provoca um aumento
300 no número dos receptores de estrógenos (REs) e receptores de progesterona (RPs),
301 enquanto uma diminuição nas concentrações desses receptores esta relacionada com um
302 aumento nos níveis plasmáticos de progesterona (GALABOVA-KOVACS et al., 2003).
303 Enquanto nos animais normais há uma diminuição nos REs sob a influência de P4, esse
304 mecanismo parece ser falho nas cadelas com HCE/piometra (DE COCK et al., 1997)

305 No final do estágio secretório (diestro) e início do anestro, o endométrio das
306 cadelas com HEC/piometra tem uma quantidade significativamente maior de REs do
307 que o observado no útero de fêmeas normais. Essa observação foi mais evidente nas
308 glândulas basais do endométrio. Como resultado desse aumento dos REs, o endométrio
309 permanece receptivo, mesmo com baixos níveis de estrógeno (E2) circulante. Isto pode
310 manter a proliferação das glândulas endometriais durante o estágio do ciclo estral,
311 quando há uma forte influência de P4. Essa ação prolongada do E2 e da P4 pode
312 explicar as modificações proliferativas císticas que caracterizam essa doença
313 (VERVERIDIS et al., 2004).

314 Quando se comparou a imunoreatividade dos RE α entre as diferentes regiões do
315 útero observou-se que o epitélio glandular foi corado com uma intensidade mais forte
316 do que o estroma, determinando uma concentração maior de RE α nessa região. Também
317 na cérvix o epitélio glandular foi corado mais intensamente quando comparado com o
318 estroma e o epitélio luminal. Levando em consideração que a concentração de
319 receptores é diretamente proporcional a intensidade da marcação, a região com o maior
320 número de RE α no útero e cérvix é o epitélio glandular. Esses resultados são contrários
321 aos observados por Dhaliwal et al (1999) que encontraram um escore muito baixo para
322 RE e RP no epitélio glandular do útero.

323 Em relação à identificação dos RPs não houve diferença significativa entre os
324 grupos de piometra aberta e fechada, entretanto, houve diferença significativa na
325 concentração de RPs entre os grupos piometra aberta e fechada quando se considerou as
326 diversas regiões do útero. A imunoreatividade foi maior no epitélio glandular de útero,
327 nas piometras fechadas. Em geral é aceito que os E2 induzem a proliferação das
328 glândulas endometriais e que a P4 induz ao aumento da atividade secretora das

329 glândulas endometriais, sendo também responsável pelo início da fase secretória. Neste
330 contexto podemos inferir que a produção de muco é maior nas piometras fechadas, uma
331 vez que as concentrações de RPs são maiores no epitélio glandular da condição fechada.

332 De acordo com Galabova-Kovacs et al (2003) existe uma relação inversa entre
333 os níveis de progesterona plasmática e as concentrações de RPs. Se considerarmos
334 nossos resultados, os valores de progesterona foram maiores (8,2 ng/mL) nas piometras
335 abertas e, portanto seria esperada uma concentração menor de RPs, o que concorda com
336 o autor acima mencionado e com a imunorreatividade observada em nossa pesquisa.

337 Receptores de P4 são menos expressos em cadelas com HEC/piometra, se
338 comparadas às fêmeas controles durante todo o diestro. A ação de P4 normalmente
339 reduz o número de RPs, portanto, RPs em menor número que o normal indica uma forte
340 ação de P4 (a despeito de uma concentração normalmente alta de P4 no diestro) e uma
341 intensa ativação de RPs em cadelas com HEC/piometra no diestro. Escores
342 imunoistoquímicos de RPs nuclear nas várias camadas do útero com HEC/piometra,
343 durante o diestro foram baixos de acordo com Dhaliwal et al. (1999). Concluiu-se neste
344 estudo, que há uma sensibilidade aumentada à ação de P4, pois altos níveis de P4
345 parecem ativar os RPs no útero, provocando uma intensa diminuição na expressão e
346 supressão do REs.

347 Não foi observada diferença nas concentrações de RPs entre a piometra aberta e
348 fechada na cérvix, entretanto, a intensidade de marcação dos RPs foram mais forte no
349 estroma quando comparadas com as intensidades mais fracas dos epitélios glandular e
350 luminal. Portanto, existe um maior número de RPs no estroma quando comparada as
351 outras regiões da cérvix.

352 Nossos resultados estão de acordo com os achados de Kunkitti et al (2011) onde
353 não foi verificado diferença significativa entre as cadelas com piometra aberta e
354 piometra fechada utilizando como variáveis o número de núcleos positivos para
355 receptores de estrógenos e progesteronas.

356 Diversos autores como De Cock et al (1997), De Bosschere et al (2002a), De
357 Bosschere et al (2002b), De Bosschere et al (2003) e Ververidis et al (2004) estudaram
358 os receptores de estrógenos e progesteronas no útero de cadelas normais e com
359 HCE/piometra. Os resultados demonstraram uma diferença importante entre o número
360 de RE e RP em cadelas com HCE e cadelas com piometra. As diferenças na expressão
361 desses receptores sugerem fatores distintos na patogênese da HCE e da piometra. Esses

362 autores, entretanto, não consideraram as diferenças dos receptores hormonais no
363 mecanismo de abertura ou fechamento da cérvix.

364 A cérvix é a parte inferior do útero que apresenta poucas fibras musculares lisas
365 e grande quantidade de tecido conjuntivo. A mucosa cervical é constituída por um
366 epitélio prismático simples de células produtoras de muco e uma lamina própria onde se
367 encontram as glândulas cervicais. Na fase secretória do ciclo estral, os elevados níveis
368 de progesterona influenciam essas glândulas a produzirem muco viscoso, que impede a
369 passagem de microorganismos e de espermatozóides para dentro da cavidade uterina
370 (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

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

378 Se acordo com Chatdarong et al (2010) uma grande proporção de colágenos na
379 cérvix de cadelas cíclicas é provavelmente associada como um aumento de estradiol
380 durante o estro isto provoca uma diminuição na tensão causando relaxamento cervical.
381 Resultados semelhantes é observado em cadelas com piometra aberta, sugerindo que a
382 abertura da cérvix é associada com o aumento na proporção de colágenos e fibras
383 musculares.

384 Analisou-se neste estudo as proporções de colágenos I e III no útero e cérvix de
385 cadelas com piometra aberta e fechada e não foram verificado diferenças significativas
386 entre as duas condições e nem entre os diversos tecidos investigados. Nossos resultados
387 demonstraram apenas que não houve diferença na proporção de colágenos entre a
388 piometra aberta e a fechada, mas as proporções entre os diversos tecidos constituintes
389 da cérvix não foram efetuados. Também um aumento nas concentrações de colágenos
390 não foram identificados na piometra fechada.

391 As hipóteses inicialmente aventadas para explicar os mecanismos de abertura e
392 fechamento cervical não se concretizaram, ou seja, a identificação e as concentrações de
393 receptores de estrógenos α e β , receptores de progesterona e colágenos I e III não estão
394 implicados nos mecanismos de relaxamento cervical. Novos estudos são necessários

abordando ainda aspectos imunoistoquímicos talvez envolvendo os receptores de prostaglandinas F2 α ou E2. Avaliações das proporções de colágeno e fibras musculares conforme o considerado por Chatdarong et al (2010) seja uma opção para o estudo da abertura cervical, bem como o exame histológico comparativo da cérvix durante o trabalho de parto.

A piometra é uma doença frequente nas cadelas e a despeito de décadas de pesquisa ainda são necessários estudos utilizando ferramentas mais sofisticadas e grupos de animais em fases hormonais bem definidas.

CONCLUSÃO

Com base nos objetivos propostos podemos concluir que os receptores de estrógeno α e β , colágenos I e III comportaram-se da mesma maneira na piometra aberta e fechada, não estando envolvidos nos mecanismos de abertura e fechamento cervical, mas concentrações de receptores de progesterona foram superiores nas piometras fechadas.

REFERÊNCIAS

- 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, p.1530-6, 2006
- BOOS, A., MEYER, W., SCHWARZ, R., GRUNERT, E. Immunohistochemical assesment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 44, p. 11-21, 1996.
- BREEVELD-DWARKASING, V.N.A., BOER-BROUWER, M, MÖSTL, E., SOEDE, N.M., WEIJDEN, G.C., TAVERNE, M.A.M., DISSEL-EMILIAN, F.M.F. Immunohistochemical distribution of oestrogen and progesterone receptors and tissue concentrations of oestrogens in the cervix of non-pregnant cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 14, p. 487-94, 2002.
- CHATDARONG, K.; LINHARATTANARUKSA, P.; SIRIVAIIDYAPONG, S.; SRISUWATAMASAKUL, S. The proportions of Smooth Muscle an Collagen in the Cervical Tissue of Bitches During Various Stages of the Estrous Cycle and Bitches Developing. **Proceedings 9th Chulalongkorn University Veterinary Science the Animal Company**. v.1, p.129, 2010.
- CHATDARONG, S.; KUNKITTI, P.; SRISUWATANASAGUL, S. P2 Distribution of Oestrogen Receptor and Progesterone Receptor and Leukocyte Infiltration in Canine

- 436 Cervical Tissue. **Proceedings 7th Chulalongkorn University Veterinary Science the**
 437 **Animal Company**. v.1, p.58, 2008.
- 438
- 439 COGGAN, J.A.; OLIVEIRA, C.M.; FAUSTINO, M.; MORENO A.M.; VON SYDOW,
 440 A.C.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R. Microbiological study of intrauterine
 441 secretion from bitches with pyometra and research of virulence factors of *Escherichia*
 442 *coli* isolates. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.71, p.1-749, 2004.
- 443
- 444 DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; TSHAMALA, M. Uterine Oestrogen and
 445 Progesterone Receptor Expression in Experimental Pyometra in the Bitch. **Journal**
 446 **Comparative Pathology** v.128, p.99-106, 2003.
- 447
- 448 DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; TSHAMALA, M.; CORY, M. Changes in
 449 sex hormone receptors during administration of progesterone to prevent estrus in the
 450 bitch. **Theriogenology** v.58, p.1209-17, 2002 b.
- 451
- 452 DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.;
 453 CORYN, M. Estrogen and progesterone receptor expression in cystic endometrial
 454 hyperplasia and pyometra in the bitch. **Animal Reproduction Science** v.70, p.251-9,
 455 2002 a.
- 456
- 457 DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; VAN DEN BROECK,
 458 W. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two
 459 entities be disconnected. **Theriogenology** v.55, p.1509-19, 2001.
- 460
- 461 DE COCK, H.; VERMEIRSCH, H.; DUCATELLE, R.; DE SCHEPPER, J.
 462 Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cystic-endometritis-pyometra
 463 complex in the bitch. **Theriogenology** v.48, p.1035-47, 1997.
- 464
- 465 DHALIWAL, G.K.; ENGLAND, G.C.W.; NOAKES, D.E. Oestrogen and progesterone
 466 receptors in the uterine wall of bitches with cystic endometrial hyperplasia/pyometra.
Veterinary Record. v.145, p.455-7, 1999.
- 467
- 468 DOW, C. The cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **The**
Veterinary Record v.70, p.1102-8, 1958.
- 469
- 470 DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **The Veterinary**
 471 **Record** v.69, p.1409-15, 1957.
- 472
- 473 FERREIRA, C.R.; LOPES, M.D. Complexo- hiperplasia cística endometrial/piometra
 474 em cadelas- revisão. **Revista Clínica Veterinária**, n.25, p.36-44, 2000.
- 475
- 476 GALABOVA-KOVACS, G., WALTER, I., AURICH, C., AURICH, J.E. Steroid
 477 receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone
 478 under in vitro conditions. **Theriogenology**, v. 61, p. 963-76, 2004.
- 479
- 480 GOERICKE-PESCH, S.; SCHMIDT, B.; FAILING, K.; WEHREND, A. Changes in
 481 the histomorphology of the canine cervix through the oestrus cycle. **Theriogenology**
 482 v.74, n.6, p.1075-81, 2010.

- HAGMAN, R.; LAGERSTEDT, A.S.; HEDHANMAR, A.; EGENVALL, A. A breed-matched case-control study of potential risk-factors of canine pyometra. **Theriogenology** v.75, p.1251-7, 2011.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Feminino. In: **Histologia Básica**. 9.ed.Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. p.367-88, 1999.
- KUNKITTI, P.; SRISUWATANASAGUL, S.; CHATDARONG, K. Distribution of estrogen receptor alpha and progesterone receptor, and leukocyte infiltration in the cervix of cyclic bitches and those with pyometra. **Theriogenology** v.75, p.979-87, 2011.
- MARTIN, I. **Avaliação imunoistoquímica dos receptores de progesterona (isoformas A e B), estrógenos α e β , hormônio luteinizante e das enzimas aromatase citocromo P450 e caspase-3 no corpo lúteo de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) durante o ciclo estral**. Botucatu, 2009. Tese (doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- MARTIN, I.; TORRES NETO, R.; OBA, E.; BURATINI JR, J.; BINELLI, M.; LAUFER-AMORIN, R.; FERREIRA, J.C.P. Immunohistochemical Detection of Receptors for Oestrogen and Progesterone in Endometrial Glands and Stroma during the Oestrous Cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) Cows. **Reproduction Domestic Animal** v.43, n.2, p.415-21, 2008.
- MARTINS, D.G. **Complexo hiperplasia endometrial cística/piometra em cadelas: fisiopatogenia, características clínicas, laboratoriais e abordagem terapêutica**. Jaboticabal, 2007. Dissertação (mestrado) Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, câmpus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista
- OLIVEIRA, K.S. Cystic endometrial hyperplasia complex. **Acta Scientiae Veterinariae** v.35, n.2, p.270-2, 2007.
- OLIVEIRA, P.C; LOPES, M.D.; THOMÉ, H.E.; BALIEIRO, J.C.C. Avaliação citológica, histológica e hormonal de cadelas normais e com complexo hiperplasia endometrial cística/piometra. **Veterinária e Zootecnia** v.15, n.1, p.150-9, 2008.
- PRETZER, S.D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. **Theriogenology** v.70, p.359-63, 2008.
- RAGNI, R.A. Pyometra in a bitch following unusual sterilisation. **Journal of Small Animal Practice** v.46, p.39-40, 2005.
- ROBINSON, R.S., MANN, G.E., LAMMING, G.E., WATHES, D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptor in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v. 122, p. 965-79, 2001.
- SANDHOLM, M.; VASENIUS, H.; KIVISTO, A.K. Pathogenesis of canine pyometra. **Journal American Veterinary Medical Association** v.167, n.11, p.1006-10, 1975.
- SMITH, F.O. Canine pyometra. **Theriogenology** v.66, p.610-2, 2006.

- 532
533 VERVERIDISA, H. N.; BOSCOA, C.M.; STEFANAKISB, A.; SARATSISA, P.;
534 STAMOUA, A.I.; KRAMBOVITISB, E. Serum estradiol-17b, progesterone and
535 espective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra
536 **Theriogenology** v.62, p.614-33, 2004.
537
538 WEISS, R.R.; CALOMENO, M.A.; SOUSA,R.S.; BRIERSDORF, S.M.; MURADÁS,
539 P. Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela.
540 **Archives of Veterinary Science** v.9, n.2, p.81-7, 2004.

Apêndice

APÊNDICE 01 : Ficha do Projeto Piometra

Nome: _____	Proprietário: _____
Raça: _____	_____
Idade: _____	Telefone res.: _____
Peso: _____	cel.: _____

Queixa principal: _____

Esta sendo tratado: ☐ NÃO ☐ SIM: _____

Fez algum tratamento nos últimos 60 dias: ☐ NÃO ☐ SIM: _____

Doenças anteriores: ☐ NÃO ☐ SIM: _____

Exame Físico: Temp: _____ FC: _____ bpm FR: _____ mpm TPC: _____ seg

Hidratação: ☐ Normal ☐ Desidratação (☐ leve ☐ moderada ☐ severa).

Linfonodos: ☐ Normal ☐ Aumentados (quais: _____)

Mucosas: ☐ normocoradas ☐ hipocoradas ☐ pálidas ☐ ictéricas ☐ congestas

Sinais clínicos: _____

Número de gestações: _____ ☐ Parto normal: _____ ☐ Cesariana: _____

Data do último cio: _____

Uso de anticoncepcional: ☐ NÃO

☐ SIM: quantas aplicações: _____

última aplicação: _____

Piometra ☐ aberta ☐ fechada

Declaro estar ciente que as informações acima serão utilizadas visando o levantamento e estudo dos casos de piometra canina e suas características clínicas, microbiológicas e histopatológicas, objetivando propiciar melhorias futuras no tratamento e controle da enfermidade:

Veterinário: _____ Data: ____/____/____

APÊNDICE 02:**TABELA 38:** Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ampicilina. Botucatu, 2011.

		Ampicilina urina			Total
		S	PS	R	
Ampicilina útero	S	6	0	0	6
	R	0	1	6	7
	Total	6	1	6	13

Teste Fisher: p-valor < 0,005 Teste Kappa: p-valor < 0,005 Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 03:**TABELA 39:** Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a amoxicilina associada a ácido clavulânico. Botucatu, 2011.

		Amoxicilina associada a ácido clavulânico urina			Total
		S	PS	R	
Amoxicilina associada a ácido clavulânico útero	S	10	0	0	10
	PS	0	1	0	1
	R	0	0	2	2
	Total	10	1	2	13

Teste Fisher: p-valor < 0,022 Teste Kappa: p-valor < 0,011 Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 04:**TABELA 40:** Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalexina. Botucatu, 2011.

		Cefalexina urina			Total
		S	PS	R	
Cefalexina útero	S	8	0	0	8
	PS	0	1	1	2
	R	0	1	2	3
	Total	8	2	3	13

Teste Fisher: p-valor < 0,008 Teste Kappa: p-valor < 0,006 Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 05:**TABELA 41:** Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalotina. Botucatu, 2011.

		Cefalotina urina		Total
		S	R	
Cefalotina útero	S	2	0	2
	PS	0	1	1
	R	0	10	10
	Total	2	11	13

Teste Fisher: p-valor < 0,02 Teste Kappa: p-valor < 0,01 Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 06:**TABELA 42:** Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ceftiofur. Botucatu, 2011.

		Ceftiofur urina			Total
		S	PS	R	
Ceftiofur útero	S	5	0	0	5
	PS	2	2	0	4
	R	0	0	4	4
	Total	7	2	4	13

Teste Fisher: p-valor < 0,002

Teste Kappa: p-valor < 0,002

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 07:**TABELA 43:** Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a doxiciclina. Botucatu, 2011.

		Doxiciclina urina		Total
		S	R	
Doxiciclina útero	S	11	0	11
	R	0	2	2
	Total	11	2	13

Teste Fisher: p-valor < 0,022

Teste Kappa: p-valor < 0,022

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 08:**TABELA 44:** Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a enrofloxacin. Botucatu, 2011.

		Enrofloxacin urina			Total
		S	PS	R	
Enrofloxacin útero	S	7	0	0	7
	PS	0	1	2	3
	R	1	0	2	3
	Total	8	1	4	13

Teste Fisher: p-valor < 0,008

Teste Kappa: p-valor < 0,006

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 09:**TABELA 45:** Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ciprofloxacina. Botucatu, 2011.

		Ciprofloxacina urina			Total
		S	PS	R	
Ciprofloxacina útero	S	7	0	0	7
	PS	1	4	0	5
	R	0	0	1	1
	Total	8	4	1	13

Teste Fisher: p-valor < 0,003

Teste Kappa: p-valor < 0,003

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 10:

TABELA 46: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a sulfa associada a trimetoprim. Botucatu, 2011.

		Sulfa associada a trimetoprim urina		Total
		S	R	
Sulfa associada a trimetoprim útero	S	10	0	10
	R	0	3	3
	Total	10	3	13

Teste Fisher: p-valor < 0,022 Teste Kappa: p-valor < 0,022 Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 11:

TABELA 47: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ampicilina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Ampicilina - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	11	3	12	28	0,451
	P.F.	1	2	2	2	7	
	Total	3	13	5	14	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 12:

TABELA 48: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a amoxicilina associada a ácido clavulânico no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

Amoxicilina + Ác. Clavulânico - Útero							p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R	Total	
Grupo	P.A.	2	21	1	4	28	0,398
	P.F.	1	5	1	0	7	
	Total	3	26	2	4	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 13:

TABELA 49: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalexina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

Cefalexina - Útero							p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R	Total	
Grupo	P.A.	2	14	6	6	28	0,650
	P.F.	1	2	2	2	7	
	Total	3	16	8	8	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 14:

TABELA 50: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalotina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Cefalotina - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	4	2	20	28	0,746
	P.F.	1	0	0	6	7	
	Total	3	4	2	26	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 15:

TABELA 51: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ceftiofur no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Ceftiofur - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	9	8	9	28	0,764
	P.F.	1	2	3	1	7	
	Total	3	11	11	10	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 16:

TABELA 52: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a doxiciclina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Doxiciclina - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	18	1	7	28	0,432
	P.F.	1	4	1	1	7	
	Total	3	22	2	8	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 17:

TABELA 53: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a enrofloxacina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Enrofloxacina - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	14	7	5	28	0,924
	P.F.	1	3	2	1	7	
	Total	3	17	9	6	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 18:

TABELA 54: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ciprofloxacina no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Ciprofloxacina - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	16	8	2	28	0,715
	P.F.	1	3	3	0	7	
	Total	3	19	11	2	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 19:

TABELA 55: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a sulfa associada a trimetoprim no conteúdo uterino quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Sulfa + Trimetoprim - Útero				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	2	22	1	3	28	0,384
	P.F.	1	4	0	2	7	
	Total	3	26	1	5	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 20:

TABELA 56: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ampicilina na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Ampicilina - Urina				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	17	5	0	6	28	0,242
	P.F.	5	1	1	0	7	
	Total	22	6	1	6	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 21:

TABELA 57: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a amoxicilina associada a ácido clavulânico na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Amoxicilina + Ác. Clavulânico - Urina				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	17	8	1	2	28	1,000
	P.F.	5	2	0	0	7	
	Total	22	10	1	2	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 22:

TABELA 58: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalexina na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Cefalexina - Urina				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	17	7	1	3	28	0,616
	P.F.	5	1	1	0	7	
	Total	22	8	2	3	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 23:

TABELA 59: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a cefalotina na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Cefalotina - Urina			Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	R		
Grupo	P.A.	17	2	9	28	1,000
	P.F.	5	0	2	7	
	Total	22	2	11	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 24:

TABELA 60: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ceftiofur na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Ceftiofur - Urina				p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R	
Grupo	P.A.	17	6	2	3	1,000
	P.F.	5	1	0	1	
	Total	22	7	2	4	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 25:

TABELA 61: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a doxíciclina na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Doxiciclina - Urina			p-valor Fisher
		Negativo	S	R	
Grupo	P.A.	17	9	2	1,000
	P.F.	5	2	0	
	Total	22	11	2	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 26:

TABELA 62: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a enrofloxacina na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Enrofloxacina - Urina				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	17	7	1	3	28	0,863
	P.F.	5	1	0	1	7	
	Total	22	8	1	4	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 27:

TABELA 63: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a ciprofloxacina na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Ciprofloxacina - Urina				Total	p-valor Fisher
		Negativo	S	PS	R		
Grupo	P.A.	17	7	3	1	28	1,000
	P.F.	5	1	1	0	7	
	Total	22	8	4	1	35	

Considerando p-valor < 0,05

APÊNDICE 28:

TABELA 64: Resultados da sensibilidade das bactérias (Sensível – S, Parcialmente Sensível – PS e Resistente – R) frente a sulfa associada a trimetoprim na urina quando comparamos os grupos piometra aberta (P.A.) e piometra fechada (P.F.). Botucatu, 2011.

		Sulfa + Trimetoprim - Urina				p-valor Fisher
		Negativo	S	R	Total	
Grupo	P.A	17	9	2	28	0,546
	P.F.	5	1	1	7	
	Total	22	10	3	35	

Considerando p-valor < 0,05