

MARILISA ANTONIAZZI CALOMENO

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, HORMONAL E BACTERIOLÓGICA NA
PIOMETRA EM CADELAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo R. Weiss

CURITIBA
2004



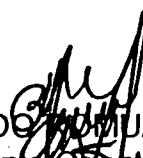
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **MARILISA ANTONIAZZI CALOMENO** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Dissertação, intitulada **“AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, HORMONAL E BACTERIOLÓGICA NA PIOMETRA EM CADELAS”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03 – CEPE considerou a candidata *Apurada* concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária.

Curitiba, 25 de março de 2004.


Prof. Dr. ROMILDO ROMUALDO WEISS
Presidente/Orientador


Prof. Dr. LUIZ ERNANDES KOZICKI
Membro


Profa. Dra. LUCIANA BATALHA DE MIRANDA
Membro

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua proteção e sabedoria.

Aos meus pais Adherbal e Eliza pelo amor e carinho.

Ao meu marido Roque pelo apoio e paciência nesta retomada profissional.

Aos meus filhos Priscila e Rafael pelo incentivo.

Ao meu orientador Prof Romildo Romualdo Weiss pela oportunidade de atualizar os meus conhecimentos.

A todos os colegas que gentilmente cederam o material para este trabalho:

Elzira Loro, JoséTavares, Hamilton Wendy, Paulo Prado, Nara Glienke, Clínica Veterinária Fantasia Animal, Nossos Bichos, Clínica Pedigree, Santa Mônica.

Ao Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná.

À Colega Alessandra Alves pela colaboração,

À minha amiga Katherinne Maria Spencoski .

À Priscila Muradas pelas sugestões na redação.

À Dra Sonia Maria Biesdorf chefe do laboratório de Bacteriologia do Centro de Diagnóstico Marcus Enrietti.

Um especial agradecimento ao Prof. Renato de Sousa pelos exames histopatológicos e as fotos presentes neste trabalho.

À professora Rosana Nogueira de Moraes por sua atenção e colaboração.

Ao laboratório CRIESP.

Ao laboratório Álvaro.

À secretaria da pós- graduação.

Ao Cnpq pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE TABELAS</u>	v
<u>LISTA DE GRÁFICOS</u>	vii
<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	ix
<u>RESUMO</u>	x
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
<u>2. REVISÃO DE LITERATURA</u>	3
<u>2.1 O ciclo estral da cadela</u>	3
<u>2.1.1 Puberdade</u>	4
<u>2.1.2 Controle endócrino do ciclo estral da cadela</u>	4
<u>2.2 Alterações histológicas</u>	6
<u>2.3 As bactérias encontradas no trato reprodutivo das fêmeas caninas</u>	8
<u>2.4 Piometra</u>	9
<u>2.4.1 Definição e sinais clínicos</u>	9
<u>2.4.2 As alterações histológicas na piometra</u>	10
<u>2.4.3 A influências dos hormônios na piometra</u>	11
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	15
<u>3.1 Animais e Amostras</u>	15
<u>3.2 Exame Bacteriológico</u>	15
<u>3.2.1 Amostras</u>	15
<u>3.2.2 Bacteriologia</u>	16
<u>3.3 Exame Histopatológico</u>	16
<u>3.3.1 Amostras</u>	16
<u>3.3.2 Histopatologia</u>	17
<u>3.4 Dosagem hormonal</u>	18
<u>3.4.1 Amostras</u>	18
<u>3.4.2 Dosagem hormonal</u>	18
<u>3.5 Análise Estatística</u>	20
<u>4. RESULTADOS</u>	21
<u>4.1 Exame bacteriológico</u>	21
<u>4.2 Exame Histopatológico</u>	22
<u>4.3 Análise estatística de comparação entre o tipo de piometra e o agente etiológico</u>	26
<u>4.4 Dosagem hormonal</u>	27
<u>5. DISCUSSÃO</u>	32
<u>5.1 Identificação do agente etiológico</u>	32
<u>5.2 Alterações Histopatológicas</u>	33
<u>5.3 Exame da dosagem hormonal</u>	34
<u>6. CONCLUSÃO</u>	37
<u>REFERÊNCIAS</u>	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DOSAGENS HORMONAIS DE PROGESTERONA E ESTRADIOL DAS CADELAS COM PIOMETRA ABERTA (n=25), ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA - PR, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A MAIO DE 2003	27
TABELA 2 - DOSAGENS HORMONAIS DE PROGESTERONA E ESTRADIOL DAS CADELAS COM PIOMETRA FECHADA (n=5) ASSISTIDAS EM CLÍNICA VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA - PR, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A MAIO DE 2003	28
TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS MÉDIAS (\pm EPM)* DE PROGESTERONA, ESTRADIOL E PROPORÇÃO ESTRADIOL/PROGESTERONA EM CADELAS COM PIOMETRA ABERTA OU FECHADA (n=30), ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA.....	28
TABELA 4 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS MÉDIAS (\pm EPM)* DE PROGESTERONA, ESTRADIOL E PROPORÇÃO ESTRADIOL/PROGESTERONA EM CADELAS DIAGNOSTICADAS COM PIOMETRA AGRUPADAS DE ACORDO COM O GRAU DE ALTERAÇÃO ENDOMETRIAL, PROVENIENTES DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA.....	29
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS, SEGUNDO A ANÁLISE DE CLUSTER (K-MÉDIAS, COM K=4), COM A IDENTIFICAÇÃO E RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS, HISTOPATOLÓGICOS E HORMONAIS PARA OS INDIVÍDUOS PERTENCENTES A CADA UM DOS GRUPOS	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	EPITÉLIO ÚTERINO NORMAL DE CADELAS COM INDICAÇÃO DA LÂMINA PRÓPRIA DA MUCOSA AUMENTO DE 40 VEZES.	23
FIGURA 2 -	EPITÉLIO UTERINO COM HIPERPLASIA CÍSTICA DE CADELAS (a), AUMENTO DE 40 VEZES..	23
FIGURA 3-	EPITÉLIO UTERINO COM HIPERPLASIA CÍSTICA ENDOMETRIAL DE CADELAS (A), AUMENTO DE 10	24
FIGURA 4 -	DILATAÇÃO CÍSTICA E INFLAMAÇÃO NA CAMADA MUSCULAR, AUMENTO DE 4 VEZES.....	24
FIGURA 5 -	PRESENÇA DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO MONONUCLEAR NO EPITÉLIO UTERINO DE CADELAS (A), AUMENTO DE 40 VEZES.	25

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DE 30 AMOSTRAS DE FRAGMENTOS UTERINOS COLHIDOS DE CADELAS DIAGNOSTICADAS COM PIOMETRA ABERTA OU FECHADA EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA-PR, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A MAIO DE 2003	22
---	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE ACORDO COM O GRAU DE COMPROMETIMENTO CELULAR, ASPECTO E TIPOS DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	17
QUADRO 2 - CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA E ESTRADIOL NAS DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL DA CADELA	19
QUADRO 3- PORCENTAGEM DE AGENTES ETIOLÓGICOS ISOLADOS DE 30 AMOSTRAS DE CORNOS UTERINOS DE CADELAS ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA-PR, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A JUNHO DE 2003.....	21
QUADRO 4 - PORCENTAGEM DE 30 AMOSTRAS DE PIOMETRAS ABERTAS E FECHADAS DE CADELAS ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A MAIO DE 2003.....	21
QUADRO 5 - COMPARAÇÃO ENTRE O HISTOPATOLÓGICO E A IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO DE CADELAS COM PIOMETRA ABERTA (n=23), ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA -PR, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A MAIO DE 2003.....	26
QUADRO 6 - COMPARAÇÃO ENTRE O HISTOPATOLÓGICO E A IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO DE CADELAS COM PIOMETRA FECHADA, (n=5) ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA - PR, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A MAIO DE 2003.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

E ²	- Estradiol
P ⁴	- Progesterona
FSH	- Hormônio folículo estimulante
HCE	- Hiperplasia cística endometrial
LH	- Hormônio luteinizante
mL	- Mililitro
min	- Minuto
ng	- Nanograma
rpm	- Rotações por minuto
TSI	Triple sugar iron
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar os níveis hormonais, as alterações histopatológicas e os agentes etiológicos encontrados na piometra aberta e fechada em cadelas. Foram colhidas 30 amostras de fêmeas ovariectomizadas em clínicas veterinárias da cidade de Curitiba, no Estado do Paraná, no período de outubro de 2002 a maio de 2003. Procedeu-se a exames bacteriológicos, análises histopatológicas dos cornos uterinos e dosagem hormonal da progesterona e do estradiol pela quimioluminescência. A bactéria isolada em maior porcentagem (36%) foi a *Escherichia coli*, e a alteração histológica de hiperplasia cística endometrial encontrada variou do grau I ao grau III. A proporção entre a progesterona e estradiol teve uma variação significativa nos dois tipos de piometra, porém não foi possível relacionar o agente etiológico, o tipo de lesão e a dosagem hormonal com o tipo de piometra, aberta ou fechada.

Palavras-chave: Piometra, cadela, aberta, fechada

ABSTRACT

The present study has the aim to evaluate the hormones levels, the histological changes and the etiological agents found in the open and closed pyometra. The uterine horns were collected from 30 ovariohysterectomized bitches in veterinary clinics in the city of Curitiba, Parana State in the period from October, 2002 to May, 2003. Bacteriological culture, histological analysis as well as hormonal dosage of progesterone and estradiol by the chemiluminescent method were made. The higher percentage (36%) from isolated bacteria was the *Escherichia coli*, and the histological analysis from cystic endometrial hyperplasia found varied from type I to type III. The progesterone/ estradiol proporcion had a significant variation in the two types of pyometra, however it was not possible to relate the etiological agent, the lesion and the hormonal dosage with the sort of pyometra: open or closed.

Keywords: Pyometra, bitch, closed, open.

1. INTRODUÇÃO

As pesquisas em reprodução de animais de estimação têm evoluído nos últimos anos com o aumento no interesse dos proprietários e criadores em buscar profissionais com conhecimento em novas técnicas. Em paralelo, aumentou também a necessidade de se desenvolverem procedimentos que possibilitem diagnósticos mais precisos, o que intensifica as pesquisas na área e possibilita a qualificação de um maior número de profissionais.

O trato reprodutivo feminino é tido como um modelo de sistema dinâmico, com amplas variações estruturais, hormonais e comportamentais. Na cadela, estas variações apresentam peculiaridades que a diferem das demais fêmeas mamíferas. A cadela possui um ciclo monoéstrico, ovulando somente uma ou duas vezes ao ano, com intervalos entre ciclos variando de 5 a 12 meses. As mudanças endócrinas observadas durante o seu ciclo são características de cada fase, sendo que algumas patologias reprodutivas podem estar associadas à endocrinologia do ciclo estral. Dentre elas, pode-se mencionar a pseudogestação e o complexo cístico endometrial ou piometra.

A piometra é a enfermidade que mais afeta o trato reprodutivo da cadela. Descrita desde 1930, apresenta sinais clínicos de polidipsia, poliúria e descarga vaginal purulenta. Sua ocorrência parece estar associada à estimulação glandular uterina por progesterona plasmática circulante, a qual é máxima durante determinadas fases do ciclo estral, levando a modificações histológicas características e favorecendo o desequilíbrio da flora vaginal e uterina. Clinicamente, a piometra pode se apresentar de duas formas: aberta, quando há a presença da descarga vaginal, ou fechada, quando a abertura cervical não permite a drenagem do conteúdo uterino.

Os mecanismos precisos envolvidos no desenvolvimento da síndrome piometra ainda não são claros. Muitos autores conjecturam que a hiperplasia cística endometrial precede a piometra, uma resposta anormal a progesterona, com uma excessiva produção de muco pelas glândulas do endométrio. Esta resposta anormal do endométrio à progesterona depende da pré-exposição ao estrogênio, pois este induz a expressão dos receptores para a progesterona. Distúrbios no tempo e/ou duração da expressão de receptores de progesterona e estrogênio podem alterar o

crescimento endometrial e levar à hiperplasia. Complicações inflamatórias e invasão bacteriana podem estar presentes, causando acúmulo de pus no lúmen uterino e conseqüente piometra.

Além dos distúrbios endócrinos de origem endógena, causas iatrogênicas podem estar associadas à piometra, uma vez que, devido ao aumento crescente da população canina, o uso de hormônios como os progestágenos e/ou estrogênios como forma de anticoncepção, tem sido muito freqüentes. O uso contínuo destas drogas pode ter como conseqüência uma propensão ao aparecimento do complexo cístico endometrial ou piometra.

Apesar dos vários estudos sobre o tema, clinicamente, a síndrome piometra ainda representa um desafio para a maioria dos profissionais, sendo difícil estabelecer tanto um diagnóstico como prognóstico preciso. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi relacionar as lesões teciduais, os agentes etiológicos e os níveis hormonais com o tipo de piometra, aberta ou fechada, de cadelas ovariectomizadas em clínicas veterinárias da cidade de Curitiba, no Estado do Paraná.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CICLO ESTRAL DA CADELA

A cadela possui um ciclo mono estral; portanto, a ovulação ocorre uma ou duas vezes ao ano, com intervalo de 5-12 meses, sendo que os oócitos primários somente amadurecem após um ou mais de dois dias de permanência no oviduto. A fase luteal da fêmea que não está prenha é similar ao período de gestação, que tem duração de 9 semanas. Observa-se que não há mudanças endócrinas nas fêmeas gestantes e nas não gestantes, somente nos casos em que existam alterações anormais como sugere GOBELLO et al. (2002/2003)

Os estágios do ciclo estral da cadela são classificados quanto a sua duração: 1) **anestro**, de 2-10 meses, no qual não se observa nenhum sinal externo da atividade ovariana; 2) **proestro**, de 3 dias a 3 semanas, que é caracterizado por sinais externos e aumento do estrogênio circulante, uma atração evidente dos machos, progressivo aumento e turgidez da vulva e períneo, podendo aparecer descarga sanguínea vaginal; 3) **estro**, de 2 a 3 dias e podendo persistir até 3 semanas, no qual a fêmea se torna receptiva ao macho; 4) **diestro**, aproximadamente 60 dias, na fêmea não gestante se estende até a diminuição da progesterona secretada na fase luteal e na fêmea prenha a fase luteal termina com o parto (OLSON et al. 1984).

Pode-se ainda dividir o ciclo estral em diferentes fases: folicular, luteal e quiescência. As fases folicular e luteal são mais prolongadas, comparadas ao ciclo de outras espécies de animais. Diferentemente destas, a cadela ovula no começo do estro, liberando oócitos primários. O útero da cadela parece não intervir na regressão do corpo lúteo (CONCANNON et al. 1989).

A duração do diestro devido às peculiaridades citadas acima predispõe a fêmea a algumas alterações como a pseudociese e a piometra conforme os estudos de GOBELLO et al. (2002/2003).

2.1.1 Puberdade

A cadela entra na puberdade entre 6 a 24 meses de idade. Em geral, os animais de pequeno porte entram na puberdade antes das raças maiores, existindo uma correlação com o crescimento do animal. O ciclo das fêmeas jovens difere das que alcançaram o estágio adulto podendo ocorrer algumas alterações. O primeiro proestro ocorre normalmente quando a cadela aproxima-se do peso de animal adulto (OLSON et al. 1984).

2.1.2 Controle endócrino do ciclo estral da cadela

As mudanças do ciclo estral estão diretamente relacionadas com as concentrações dos hormônios sexuais, sendo que no proestro as alterações tanto comportamentais quanto fisiológicas são causadas pelo aumento da concentração de estrogênio nesta fase. A alteração comportamental da fêmea se caracteriza pela atração do macho, sem permitir a cópula. O estradiol é sintetizado pelas células da granulosa dos folículos ovarianos em desenvolvimento. O início do proestro está associado à concentração de estrogênio acima de 25 pg/mL, atingindo o pico máximo com concentrações em torno de 60 a 70 pg/mL, 24 a 48 horas antes de seu término. Esta onda de estrogênio dura de um a dois dias e precede o pico pré-ovulatório do LH, retornando progressivamente às concentrações basais (15 pg/mL) durante os próximos 5 a 20 dias (GOODMAN, 2001).

O LH é uma gonadotrofina liberada pela hipófise anterior de forma pulsante, o qual estimula a maturação, luteinização e ovulação dos folículos. No início do proestro observa-se uma série de pequenas, porém potentes, ondas de LH que retornam a concentrações basais logo em seguida e elevam-se em amplitude e frequência ao final do período, até alcançar um pico em aproximadamente 48 horas antes da maioria das ovulações. Esta onda pré-ovulatória de LH tem uma duração de 24 a 72 horas e é mais longa que a maioria das outras espécies (CONCANNON et al, 1989).

Já no estro, a mudança comportamental característica é a receptividade da fêmea ao macho, permitindo o coito. A cadela começa a apresentar os sinais do estro quando a concentração de estrogênio circulante começa a declinar e a progesterona sérica aumenta. Este fato deve-se à luteinização das células da granulosa dos folículos maduros, que passam a produzir progesterona, levando ao aumento de sua concentração no sangue. Outro evento estimulado pela queda de estrogênio e elevação da progesterona é o *feedback* positivo sobre o hipotálamo e hipófise, o qual resulta na onda pré-ovulatória de LH. Conforme CONCANNON et al. (1989), essa onda pré-ovulatória, na maioria dos ciclos, ocorre um dia antes da transição do proestro para o estro.

A progesterona é produzida pelas células da granulosa nos folículos maduros que sofrem luteinização sob influência do LH antes do estro. A concentração de progesterona começa a aumentar um dia após o aparecimento do pico de estrogênio na fase folicular. As concentrações circulantes de progesterona são basais (<0,5 ng/mL) até 24 a 72 horas antes do final do proestro, quando se eleva acima de 1,0 ng/mL. No momento da onda pré-ovulatória de LH, a concentração de progesterona encontra-se em torno de 2 a 4 ng/mL. Esta elevação na concentração de progesterona é considerada responsável pelo comportamento receptivo da fêmea ao macho (FELDMAN e NELSON, 1987).

A ovulação, que é espontânea na cadela, ocorre 24 a 72 horas após a onda de LH, entre o 2º. ou 3º. dia do estro, 24 a 48 horas após a aceitação do macho pela fêmea. A cadela ovula ovócitos primários, a primeira divisão meiótica se completa no oviduto dentro de três dias após a ovulação. Altos índices de fertilidade estão associados a coberturas ocorridas entre os dias zero a cinco após o pico de LH (HOLST et al, 1971).

No diestro, o edema vulvar diminui progressivamente até desaparecer. A cadela torna-se calma e a atração pelos machos logo decresce. Esta fase é dominada pela progesterona, que atinge um pico máximo de 15 ng/mL a 60 ng/mL duas a três semanas após o início deste estágio, declinando gradualmente até atingir valores basais no final do período, enquanto os outros hormônios encontram-se essencialmente em concentrações basais. O útero responde ao aumento de progesterona mantendo a estrutura glandular e vascularização adequada para a

gestação. A duração do diestro, baseada na função lútea, é similar para cadelas não gestantes e gestantes (OLSON et al. 1984).

Os corpos lúteos da cadela gestante são sensíveis aos efeitos luteolíticos da prostaglandina, embora não tanto quanto o observado na maioria das outras espécies (CONCANNON, et al. 1989).

No anestro não há diferenças clínicas aparentes entre um animal em diestro não gestante e um em anestro, sendo que esta fase se caracteriza pela inatividade sexual. Neste período, o útero encontra-se em processo de involução após os efeitos de gestação ou pseudogestação. A completa involução do útero ocorre aos 120 dias no ciclo sem gestação e aos 140 dias no ciclo com gestação, podendo explicar o período interestrual em cadelas normais (FELDMAN e NELSON, 1987).

Durante anos, o anestro foi considerado uma fase de repouso no ciclo reprodutivo da cadela. Porém, segundo OLSON et al. (1984), nem a hipófise nem os ovários encontram-se quiescentes neste período

No início e meio do anestro, as concentrações de estradiol e progesterona encontram-se basais, havendo elevação do estradiol no final. A concentração de FSH encontra-se basal no início e meio do anestro apresentando aumento no final deste período. O surgimento episódico de LH pode ser detectado durante o anestro, apresentando maior intensidade em seu término (KOOISTRA et al, 1999).

2.2 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS

O trato reprodutivo feminino é constituído pelos ovários, tubas uterinas, útero, cérvix e vagina.

Os ovários são constituídos por folículos ovarianos, estroma de sustentação, irrigação sanguínea e linfática. A córtex é revestida externamente pela túnica albugínea, um tecido conjuntivo denso. A medular do ovário possui um conjunto de vasos sanguíneos, nervos e tecido conjuntivo de sustentação.

A tuba uterina é um órgão tubular, recebe o oócito, fornecendo condições necessárias para a fertilização. É dividida em infundíbulo, ampola e istmo. É formada por uma mucosa de epitélio colunar ciliado e células secretoras. Possui uma camada muscular lisa, e externamente é revestida por uma serosa mesotelial (NASCIMENTO e SANTOS, 1997)

O útero é um órgão cavitário de parede espessa, com grande capacidade de distender e voltar ao seu tamanho normal. É constituído pelo endométrio, miométrio e serosa. (KENNEDY e MILLER 1992).

O endométrio é o local de implantação do embrião, formando a base uterina da placenta pela transformação tecidual. Também sofre modificações estruturais e funcionais conforme a atividade endócrina do ovário (COCK et al. 2002).

A mucosa uterina é modificada pela ação dos hormônios esteróides, progesterona e estrogênio. O estrogênio atua no útero proliferando as glândulas endometriais, aumentando a vascularização, fluxo sanguíneo e atividade metabólica, iniciando a fase proliferativa (DHALIVAL et al. 1999)

A fase secretória ou progestacional atua no espessamento do endométrio e no aumento de secreção das glândulas endometriais, nas células o núcleo se desloca para a posição basal livre do citoplasma e o seu lúmen está relativamente grande (SILVA et al. 1995).

O miométrio é formado por fibras lisas da camada muscular dispostas em feixes cilíndricos ou achatados sendo separados por septos delgados e conjuntivos. Abaixo da mucosa encontra-se o estrato submucoso constituído por fibras longitudinais (KENNEDY e MILLER 1992).

As alterações histológicas estão relacionadas com as diferentes fases do ciclo estral, de modo que, na fase do proestro, as descargas vaginais hemorrágicas são causadas pela diapedese eritrocitária através do endométrio e ruptura capilar subepitelial. Durante este período, a fêmea apresenta a vulva edemaciada e hipertrofiada, a cérvix dilatada, o endométrio espessado, aumento na atividade glandular e no crescimento dos ductos e túbulos da glândula mamária (GILBERT, 1992). Essas mudanças são em virtude do desenvolvimento do endométrio que é modificado pela ação do estrogênio. Com a aproximação do período fértil e o início do estro, a preparação do útero é evidente com proliferação de células do endométrio, diminuindo o sangramento e aumentando a atividade das glândulas endometriais. Com o término do estro, o endométrio, muda gradativamente dependendo do estado do animal, conforme GALABOVA et al. (2003).

O ciclo se completa quando o útero involui até o seu tamanho normal. Ocasionalmente, estas mudanças podem se prolongar, causando importantes alterações, como a pseudogestação e a piometra (CONCANNON et al. 1989).

Os estudos de LEITNER et al. (2003) confirmam as drásticas alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral, as quais modulam a estrutura e a fisiologia do trato reprodutivo da cadela, como consequência, a estrutura uterina torna-se susceptível a endometrites, neoplasias e a piometra.

2.3 AS BACTÉRIAS ENCONTRADAS NO TRATO REPRODUTIVO DAS FÊMEAS CANINAS

As bactérias, encontradas na flora normal do trato reprodutivo da cadela, são diversificadas. ALLEN et al. (1982) isolaram, de esfregaços vaginais, a *Escherichia coli* em maior porcentagem.

WATTS et al. (1996) coletaram do útero de cadelas amostras para cultura de microorganismos e identificaram diferentes grupos bacterianos nas diferentes fases do ciclo estral. Foram isoladas *Escherichia coli*, em maior frequência, *Haemophilus spp*, *Streptococcus spp*, *Corynebacterium spp*, *Streptococcus canis*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacteroides spp*, *Pasteurella spp* e *Proteus mirabilis*. Esse estudo indicou que o útero normal da cadela tem uma microflora durante o proestro e o estro similares ao da vagina e da cérvix e que raramente são encontradas no diestro e anestro. Esse aumento de microorganismos, pode ser pela queda da resposta do sistema imune

A presença de glóbulos brancos no esfregaço vaginal durante o diestro foi ressaltado por WRIGHT e PARRY (1989) refletindo uma resposta inflamatória do útero à proliferação de microorganismo.

A ausência de microorganismo durante a gestação e o diestro é importante, pois o útero está sensibilizado pelas alterações ocorridas nestas fases e não tem condições adequadas para uma resposta imunológica adequada, enfatiza HARDLEY (1975).

Em animais saudáveis o número de microorganismos é substancialmente menor, sendo normal encontrar culturas bacterianas positivas sem, contudo, caracterizar uma endometrite ou outro tipo de alteração. Para caracterizar a confirmação de um diagnóstico de doença uterina são requeridos exames

complementares como o radiológico e o ultra-sonográfico, além de análises laboratoriais (WADAS et al. 1996).

NOMURA et. al.(1990) ressaltaram que a hiperplasia cística endometrial é seqüela comum quando o útero é exposto a traumas e invasão bacteriana quando os níveis de progesterona estão elevados.

2.4 PIOMETRA

2.4.1 Definição e sinais clínicos

KUSTRITZ (2002) descreve que as alterações diestro do trato reprodutivo da cadela podem ser consideradas como uma síndrome, com variações clínicas patológicas importantes. Esta síndrome recebeu diversas denominações, como: hidrometra, piometrite, endometrite catarral, metrite purulenta, endometrite cística crônica e hiperplasia cística endometrial. Embora em alguns casos, etiologicamente estes nomes estejam adequados, o termo piometra deve ser usado quando existe uma reação infecciosa, pois o termo “pio” é relacionado com a produção de pus.

KENNEDY e MILLER (1992) conceituaram que a hiperplasia cística não é um distúrbio neoplásico das glândulas endometriais e sim um aumento de volume das mesmas por ação hormonal.

NOMURA (1983), sobre a etiologia da piometra, sugere que a causa primária seria por um desequilíbrio ovariano; posteriormente, estudos concluíram que não existia diferença significativa dos níveis hormonais entre cadelas com piometra e cadelas normais.

GANDOTRA et al. (1994) definiram que a piometra nas cadelas é uma desordem da fase do diestro, mediada por alterações hormonais, resultando na interação bacteriana e em anormalidades no endométrio por uma resposta exagerada ao estímulo da progesterona, o que corrobora o estudo de COCK et al. (1997).

Os estudos realizados por FRANSON et al. (1997) relataram que os sinais clínicos mais comuns desta patologia são: poliúria, polidsia, anorexia, depressão,

vômito, descarga vaginal e distensão do abdômen, podendo também, em muitos casos, haver comprometimento cardiovascular.

2.4.2 As alterações histológicas na piometra

NASCIMENTO et al. (1986) descreveram na histopatologia um quadro inflamatório típico, pois os cornos uterinos encontravam-se distendidos preenchendo grande parte da cavidade peritoneal. Quando em formas mais graves, apresentavam forte odor e aspecto mucopurulento. Os mesmos autores descreveram os seus achados de acordo com a classificação de DOW (1959), sendo que o grau I é uma hiperplasia endometrial cística caracterizada por não apresentar nenhuma reação inflamatória, a hiperplasia endometrial cística do grau II está associada à infiltração de mononucleares. Já a hiperplasia de grau III possui uma intensidade variável, associada à infiltração de polimorfos mononucleares e com comprometimentos mais severos. A hiperplasia de grau IV está associada a uma fibrose do miométrio.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, GILBERT (1992) referiu-se à piometra como uma interação entre o potencial patogênico das bactérias e as alterações endometriais. A bactéria mais encontrada nesta patologia é a *Escherichia coli*, a qual possui a capacidade de se aderir aos sítios da progesterona nos receptores presentes no endométrio. O grau de distensão das paredes uterinas varia de acordo com a quantidade de exudato, de aspecto serosanguinolento ou mucopurulento, presente no útero.

Segundo COCKCROFT (1995), a piometra afeta as cadelas na fase do diestro, podendo ser difusa ou focal e em alguns animais estas alterações comprometem o epitélio endometrial. Os segmentos uterinos são severamente afetados nas formas não difusas, caracterizando áreas focais, sendo que os achados histopatológicos revelam uma distensão das glândulas endometriais, alcançando as paredes do miométrio que se encontram edematosas.

Algumas observações realizadas por COCK et al. (1997), utilizando a análise imunoistoquímica dos receptores de estrogênio, revelaram alterações histológicas caracterizadas como metaplasia escamosa da superfície do epitélio endometrial do útero, hiperplasia cística das glândulas endometriais e moderada infiltração de células mononucleares na lâmina própria do útero. Esse estudo sugeriu que as

anormalidades dos receptores de estrogênio são um fator importante no desenvolvimento da piometra.

A variação da hiperplasia endometrial resulta da deformação cística das glândulas endometriais, com proliferação de fibroblastos e reação inflamatória nos casos de endometrite e piometra. Nos casos de endometrite de grau médio é questionável se as deformações das glândulas uterinas são fisiológicas ou patológicas (DE BOSSCHERE et al. 2001).

Para auxiliar no diagnóstico da piometra, podem-se avaliar as secreções uterinas, pois essas se encontram alteradas quando há um processo inflamatório no útero. LEITNER et al. (2003) avaliaram os glicoconjugados do endométrio pelo método da lecitina histoquímica, em cadelas saudáveis, em cadelas com hiperplasia cística endometrial e com piometra, para diferenciar os níveis de glicoconjugados destes três grupos. Estes autores concluíram que o declínio dos níveis de progesterona, durante o anestro e diestro, altera os efeitos do estradiol e da progesterona no epitélio uterino.

As imagens ultrasonográficas também são úteis para distinguir as alterações morfológicas das paredes uterinas. A serosa e a muscular, quando estão edemaciadas, podem medir de 2-3 mm de espessura. O endométrio hiperplásico pode alcançar 7-10mm de espessura. Assim, o ultra-som é uma importante ferramenta na análise da extensão e severidade da piometra (ENGLAND et al. 2003).

2.4.3 A influências dos hormônios na piometra

BLENDIGER et al. (1997) postularam que o estradiol e a progesterona atuam nos diferentes estágios de secreção do endométrio, bem como na inibição da atividade miometral devido à redução do cálcio intracelular que conseqüentemente altera a contratilidade da cérvix. Também relataram que a piometra pode ocorrer em qualquer estágio do ciclo estral, porém a maioria dos casos ocorre na fase do diestro.

COCK et al. (1997) tentaram correlacionar as concentrações dos hormônios esteróides com a aparência macroscópica dos tecidos uterinos nos diferentes estágios do ciclo estral da cadela. Concluíram que o tecido uterino se apresentava

macroscopicamente patológico na fase luteal, o que atesta os trabalhos de DOW e JENSEN et al. (1984).

Da mesma forma, DE BOSSCHERE et al. (2002) destacaram a participação da progesterona no desencadeamento inicial do complexo hiperplasia cística endometrial, muito embora os níveis hormonais de animais com piometra não sejam muito diferentes dos animais normais.

Por outro lado, GOBELLO et al. (2003) assinalaram que existem controvérsias quanto às alterações nos níveis hormonais, devido à administração de progestágenos como contraceptivos. Inicialmente, a teoria predominante seria a de que as alterações endometriais são influenciadas pela progesterona. Contudo, esta é uma hipótese ainda a ser confirmada.

DHALIWAL et al. (1999) definiram a hiperplasia cística endometrial como uma alteração do útero e que normalmente ocorre durante a fase luteal do ciclo estral. A administração de altas doses de progesterona, em cadelas normais por um período prolongado, pode resultar no desenvolvimento de lesões uterinas que são comparáveis com à hiperplasia cística endometrial. Os estudos sugeriram que as mudanças na concentração, distribuição, expressão dos receptores de progesterona e estrogênio estariam envolvidos na patogenia da hiperplasia cística endometrial, a qual pode ser induzida pela administração de hormônios exógenos em cadelas normais, corroborando estudos de BLENDIGER et al. (1997).

A hiperplasia cística endometrial é uma resposta fisiológica do útero quando exposto ao aumento de estrogênio e progesterona, porém há regressão no fim da fase luteal. Em condições anormais, aparecem complicações que se refletem na enfermidade conhecida como complexo cístico endometrial (ENGLAND et al. 2002).

Da mesma forma, COX (1970) e SOKOLOWSKI et al. (1973) descreveram o aparecimento de hiperplasia cística endometrial em cadelas devido à administração de progestágenos e estrogênios como contraceptivos. Recentemente, DE BOSSCHERE et al. (2002), experimentalmente, administraram progestágenos em cadelas e observaram que há uma dependência hormonal, que resulta em uma infecção bacteriana e conseqüentemente em piometra.

Por outro lado, MUNSON et al. (2002), em estudos com felinos selvagens de zoológicos, relacionaram o aparecimento de hiperplasia cística com a administração

de progestágenos como contraceptivos. Em muitos destes, a piometra foi diagnosticada.

Estudos recentes sugerem que uma sobre dosificação com progestágenos poderia causar piometra além de outras complicações, como: resistência insulínica, diabetes, hepatomegalia, enfermidades da vesícula biliar e tumores mamários (LACROIX e RAMIREZ, 2001).

Estudos realizados por HOLST et al. (2001) relacionaram que a causa primária da piometra em cadelas pode ser devido a mudanças hormonais e que a idade dos animais é um fator importante no desenvolvimento da doença, o que também foi confirmado nos estudos de DE BOSSCHERE et al. (2002).

É extremamente raro que a piometra ocorra em cadelas que não estejam sobre influência da progesterona (diestro), principalmente quando a infecção é inicial. Ocorre sim, em outros estágios, quando a doença se desenvolve lentamente (DE BOSSCHERE et al. 2002).

GALABOVA et al. (2003) focalizaram a importância de estudos mais detalhados do ciclo estral da cadela, principalmente a luteinização dos folículos antes da ovulação e o ciclo de eventos do endométrio, sendo que a utilização de exames complementares para a sua compreensão, entre estes a imunoistoquímica, estão sendo largamente empregados para estes fins.

Enfatizando este aspecto, DHALIWAL et al. (1997) utilizaram a imunoistoquímica para observar a distribuição e a concentração dos hormônios durante os diferentes estágios do ciclo estral da cadela.

Na continuação de seus estudos, DHALIWAL et al. (1999) monitoraram as alterações uterinas por meio de imunoistoquímica e concluíram que há uma larga variabilidade de receptores para o estrogênio e para a progesterona.

Atualmente, as pesquisas estão ressaltando a necessidade de mapeamento dos receptores dos hormônios esteróides no útero como o estudo de LEITNER et al. (2003), que definiram a piometra como uma síndrome diestral em cadelas e supuseram que as causas estão relacionadas com os distúrbios hormonais, mudanças do endométrio e nos receptores dos hormônios esteróides.

Desta forma, atualmente os trabalhos estão focados em alguns exames específicos dos receptores hormonais e usam como ferramenta investigativa a imunoistoquímica.

Os relatos de experimentos que sugerem tratamento hormonal com prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) no lugar da ovariectomia têm a intenção de preservar a genética do animal (LANGE et al. 1997).

ROMAGNOLI et al. (2002) também verificaram a eficácia desta droga em baixas doses como um tratamento efetivo na piometra, o que é confirmado também por ENGLAND e LOFSTEDT (2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E AMOSTRAS

No presente experimento foram utilizadas 30 cadelas, de raça, idade e peso corporal variáveis, encaminhadas a Clínicas Veterinárias de Curitiba-PR ou ao Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, com sinais clínicos de piometra. Na seqüência foram submetidas ao procedimento cirúrgico de retirada dos ovários e do útero. A avaliação clínica, diagnóstico e tratamento instituído foram definidos pelo Médico Veterinário responsável de cada instituição, não tendo sido possível, portanto, estabelecer protocolos padronizados. Das informações disponíveis a partir do histórico clínico dos animais, a maioria das fêmeas encontrava-se na fase do diestro. Os casos em que não foi observada descarga vaginal purulenta foram considerados como piometra fechada. Para cada uma das fêmeas estudadas, amostras de sangue, fragmentos do útero e “swabs” do conteúdo uterino, foram obtidos logo após a indução da anestesia geral ou imediatamente após o término do procedimento cirúrgico. Detalhes de colheita, armazenamento e processamento das amostras, são apresentados a seguir.

3.2. EXAME BACTERIOLÓGICO

3.2.1. Amostras

Após a remoção cirúrgica asséptica do útero, uma amostra da secreção ou exudato uterino foi colhida, com o auxílio de um “swab” estéril, aplicado suavemente em cada corno uterino, tomando-se o máximo de cuidado possível para evitar contaminação da amostra. Após isso, o “swab” foi acondicionado em frasco de vidro de 5mL, esterilizado, fornecido pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (Departamento de Fiscalização, Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento), onde as amostras foram processadas. Do momento da colheita até

a chegada ao laboratório, as amostras foram mantidas resfriadas em recipientes com gelo.

3.2.2. *Bacteriologia*

As amostras foram semeadas simultaneamente em ágar sangue de carneiro desfibrinado (AS), ágar MacConkey (MC) e caldo de enriquecimento brain heart infusion (BHI), incubadas à 35°C, durante 24 horas. Após este período, foi realizado o exame bacterioscópico por meio da coloração de Gram, de acordo com metodologia descrita por KONEMAN et al. (2001).

As bactérias classificadas como Gram-Positivas, foram na seqüência, testadas para as provas da catalase, coagulase, oxidase e teste da oxidação – fermentação para a sua identificação, segundo QUINN et al. (1994).

As colônias que cresceram no ágar MacConkey, tanto lactose positivas quanto negativas, foram inoculadas em ágar triple sugar iron (TSI) e incubadas à 35°C por 24 horas. Quando as amostras incubadas nos tubos do meio TSI apresentaram reações compatíveis com as produzidas por enterobactérias, a colônia era submetida a provas complementares. Nestas provas foram incluídas as reações de: INDOL, utilização de citrato, reação com vermelho de metila, motilidade, uréia e produção de acetil-metil carbinol (reação de Voges Proskauer), segundo EDWARDS e EWING (1972).

3.3. EXAME HISTOPATOLÓGICO

3.3.1. *Amostras*

Para o exame histopatológico, fragmentos de tecido uterino, com medida aproximada de 15 a 20 mm², foram seccionados com tesoura da região crânio medial de cada corno uterino. As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro estéreis, contendo 5mL com formol a 10% e em seguida foram encaminhadas

ao Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Medicina Veterinária, da UFPR, onde foram processadas e analisadas.

3.3.2. Histopatologia

Os fragmentos de tecido uterino foram fixados em formol e seccionados transversalmente, embebidos em parafina, seccionados novamente no tamanho de 7µm, colocados em lâmina de microscopia e corados com hematoxilina e eosina, segundo protocolos básicos de histologia.

Após a análise em microscopia óptica, as alterações histológicas encontradas foram classificadas em diferentes níveis, seguindo as descrições contidas no QUADRO 1.

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE ACORDO COM O GRAU DE COMPROMETIMENTO CELULAR, ASPECTO E TIPOS DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS.

GRAU	alteração	aspecto	células	características
I (acentuada)	Dilatações císticas de glândulas endometriais	Eosinofílico amorfo	Neutrófilos Linfócitos Plasmócitos	Infiltrado inflamatório com focos hemorrágicos
II (moderada)	Dilatações císticas de glândulas endometriais	Infiltrado inflamatório difuso e acentuado	Neutrófilos macrófagos	Congestão e hemorragia difusa moderada
III (leve)	Hiperplasia leve	Leve Infiltrado inflamatório	Linfoplasmócitos Neutrófilos	Infiltrado inflamatório na mucosa
Infiltrado inflamatório	Sem caracterização de hiperplasia	Leve Infiltrado inflamatório	Polimorfos nucleares	Células inflamatórias na mucosa e muscular

NOTA: Adaptado DOW (1959)

3.4. DETERMINAÇÃO HORMONAL

3.4.1. Amostras

Para a dosagem hormonal foram colhidos 3mL de sangue através de punção da veia braquiocéfálica ou da jugular de cada fêmea, durante a anestesia. Cada amostra foi transferida para frascos de vidro de 5mL, marca Beckton-Dickson, estéreis, sem anticoagulante e mantidas refrigeradas. da marca. Dentro de no máximo 1 hora após a colheita, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min., para separação do soro. Aproximadamente 1 mL do soro sobrenadante foi em seguida transferido para outro tubo de vidro estéril, com a identificação do animal. As amostras de soro, assim obtidas, foram envasadas em caixas de isopor com gelo e enviadas no mesmo dia da colheita para o Laboratório de Análises Clínicas Álvaro, em Cascavel – PR, para determinação do estradiol e da progesterona. O transporte foi feito à noite, entre 21:00 horas e 07:00 horas da manhã seguinte, por via terrestre, sendo as análises hormonais realizadas sempre no intervalo máximo de 24 horas após colheita.

3.4.2. Determinação hormonal

Cada amostra de soro foi analisada para concentração de estradiol e progesterona através do método imunoenzimático de quimioluminescência (IMMULITE), utilizando-se o kit de progesterona e estradiol ADVIA CENTAUR (Bayer), seguindo o protocolo padrão do fabricante e sistema automatizado de execução, leitura e cálculos para o ensaio. Resumidamente, neste tipo de teste, a fase sólida, uma pérola de polietileno encapsulada dentro das Unidades Teste IMMULITE, é recoberta com anticorpo policlonal de coelho específico para o hormônio de interesse. O soro do paciente e o hormônio marcado com o ligante são simultaneamente introduzidos na Unidade Teste, e incubadas por aproximadamente 30 minutos à 37° C com agitação. Durante este período o hormônio da amostra compete com o hormônio marcado com ligante pelos sítios ligantes do anticorpo na

pérola. O material não ligado é removido por uma lavagem e centrifugação. O antiligante, marcado com fosfatase alcalina, é introduzido na unidade teste, seguida de novo ciclo de incubação de 30 minutos. A enzima conjugada não ligada é removida por uma lavagem de centrifugação. O substrato é adicionado à Unidade Teste e a mesma é incubada por mais 10 min. O substrato quimioluminescente é submetido à hidrólise em presença da fosfatase alcalina gerando um intermediário instável. A produção contínua deste intermediário resulta na emissão ininterrupta de luz. O complexo ligado, assim como sua emissão de fótons, medidos pelo luminômetro, é inversamente proporcional à concentração de hormônio na amostra.

O sistema IMMULITE automaticamente manuseia a amostra, as adições de reagentes, os passos de incubação, separação e a mensuração da emissão de fótons pelo luminômetro com temperatura controlada. O sistema calcula os resultados dos testes para amostra de pacientes e controles em função do sinal observado, usando uma curva padrão estocada no mesmo e gera um relatório impresso que inclui todas as demais informações dos pacientes previamente inseridas via computador (BABSON 1991).

A acurácia do método é descrita conforme procedimento de KUTZLER et al. (2003) e KUSTRITZ (2001).

Os valores de referência descritos nas diferentes fases do ciclo sexual em cadelas estão resumidos no QUADRO 2.

QUADRO 2 - CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA E ESTRADIOL NAS DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL DA CADELA

Fases do ciclo estral	Valores de referência	
	Progesterona ng/mL	Estradiol pg/mL
Proestro	1,0 a 2,0	15,0 a 50,0
Estro	1,0 a 20,0	15,0 a 50,0
Diestro	15,0 a 80,0	< 15,0
Anestro	< 1,0	< 15,0

FONTE: (FELDMAN E NELSON, 1996).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os valores hormonais, foram calculadas as médias e o erro padrão da média (EPM) para os dados agrupados segundo 3 categorias: 1) tipo de piometra (aberta ou fechada); 2) grau de alteração histopatológica do endométrio (HCE leve, moderada, acentuada ou endometrite); 3) semelhança entre os valores séricos obtidos para a progesterona e o estradiol, bem como a proporção entre estradiol/progesterona, utilizando o método de análise de Cluster para a identificação dos indivíduos mais próximos entre si. Diferenças significativas entre os grupos, para os dados hormonais, foram verificadas por análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Duncan, com alfa de 5%.

Para a análise de Cluster, foi utilizado o método das K-médias, sendo que o valor de k foi definido como quatro (4), seguindo o número de categorias adotadas para a classificação dos achados histopatológicos. Para o agrupamento, utilizou-se os valores obtidos para a progesterona, estradiol e proporção estradiol/progesterona, calculando-se as médias para cada grupo ou "Cluster" e selecionando os indivíduos com as menores distâncias Euclidianas em relação à medida central de cada "Cluster", os quais, segundo os conceitos básicos da análise de agrupamento, seriam os mais semelhantes entre si, dentro de cada grupo, e os mais diferentes, entre os grupos. O objetivo deste tipo de análise no presente estudo foi verificar o grau de semelhança para as demais variáveis (tipo de piometra, grau de alteração endometrial e agente bacteriológico identificado) entre os indivíduos agrupados em cada "Cluster", na tentativa de verificar possíveis relações entre as variáveis.

Para os dados de bacteriologia, os animais foram agrupados segundo o tipo de piometra (aberta ou fechada) e possíveis diferenças entre os grupos para o agente etiológico foram detectadas com o teste Qui-quadrado ($\text{Qui-quadrado} = \sum[(\text{observado} - \text{esperado})^2 / \text{esperado}]$; com alfa de 1%).

Todos os cálculos e análises foram realizados com o programa Statistica para windows (Statsoft corporation, 1995).

4. RESULTADOS

4.1 EXAME BACTERIOLÓGICO

Foram colhidas 30 amostras de secreções dos cornos uterinos de 30 cadelas pós-ovariohisterectomia, sendo que o exsudato uterino apresentava-se com odor fétido característico e aspecto muco purulento com coloração de amarelada a marrom escura.

QUADRO 3 - PORCENTAGEM DE AGENTES ETIOLÓGICOS ISOLADOS DE 30 AMOSTRAS DE CORNOS UTERINOS DE CADELAS ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA-PR, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A JUNHO DE 2003.

Agente etiológico	n	%
<i>Escherichia coli</i>	11	36
<i>Streptococcus spp</i>	5	16
<i>Staphilococcus spp</i>	4	14
<i>Enterobacter spp</i>	3	10
<i>Proteus spp</i>	2	7
<i>Pasteurela aeroginosas</i>	2	7
<i>Citrobacter spp</i>	1	3
<i>negativo</i>	2	7
Total	30	100

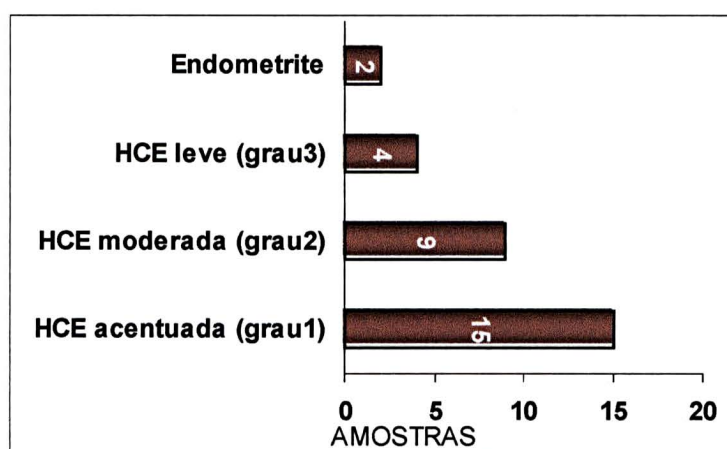
QUADRO 4 - PORCENTAGEM DE 30 AMOSTRAS DE PIOMETRAS ABERTAS E FECHADAS DE CADELAS ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A MAIO DE 2003

Tipos de piometra	n	%
Aberta	25	83,33
Fechada	05	16,67
Total	30	100

4.2. Exame Histopatológico

Os resultados dos achados histopatológicos estão representados no GRÁFICO 1. Constatou-se um elevado número de hiperplasia cística endometrial acentuada seguida por uma hiperplasia cística endometrial moderada.

GRÁFICO 1 - RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DE 30 AMOSTRAS DE FRAGMENTOS UTERINOS COLHIDOS DE CADELAS DIAGNOSTICADAS COM PIOMETRA ABERTA OU FECHADA EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA-PR, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A MAIO DE 2003.



*HCE- Hiperplasia cística endometrial.

As figuras a seguir são resultados da análise histopatológica de algumas amostras.

Na FIGURA 1 observa-se o útero com sua morfologia normal, na FIGURA 2 epitélio uterino com hiperplasia cística endometrial.

FIGURA 1 - EPITÉLIO ÚTERINO NORMAL DE CADELAS AUMENTO DE 40 VEZES.

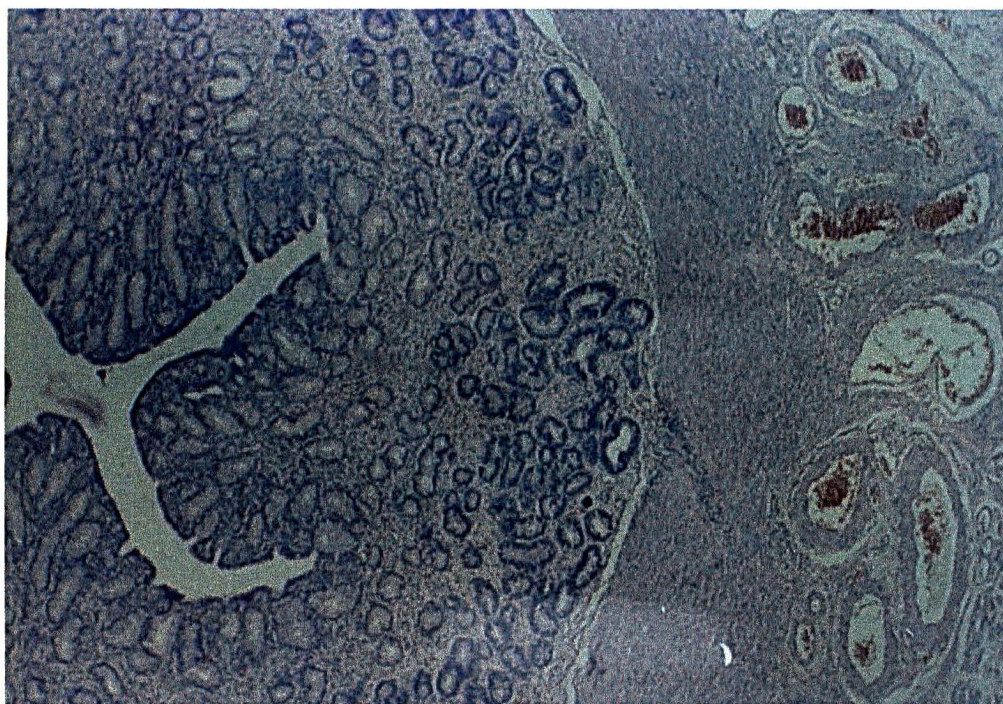


FIGURA 2 - EPITÉLIO UTERINO COM HIPERPLASIA CÍSTICA DE CADELAS (a), AUMENTO DE 10 VEZES.

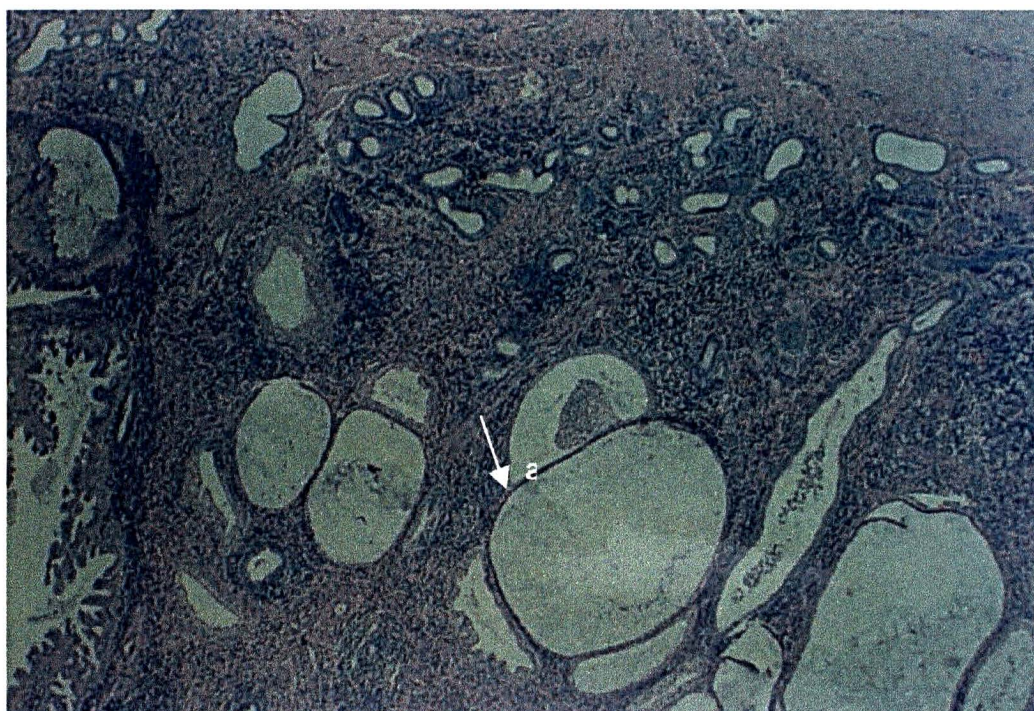


FIGURA 3 - EPITÉLIO UTERINO COM HIPERPLASIA CÍSTICA DE CADELAS (a), AUMENTO DE 10 VEZES.

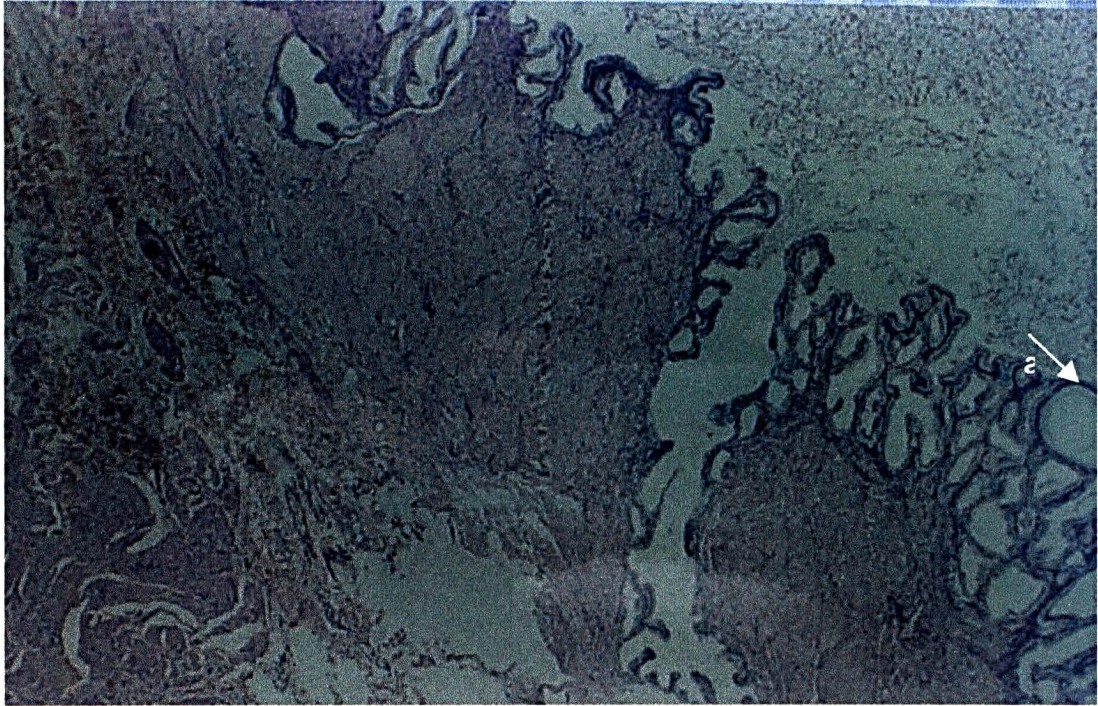


FIGURA 4- DILATAÇÃO CÍSTICA E INFLAMAÇÃO NA CAMADA MUSCULAR DO EPITÉLIO UTERINO DE CADELAS (a), AUMENTO DE 10 VEZES.

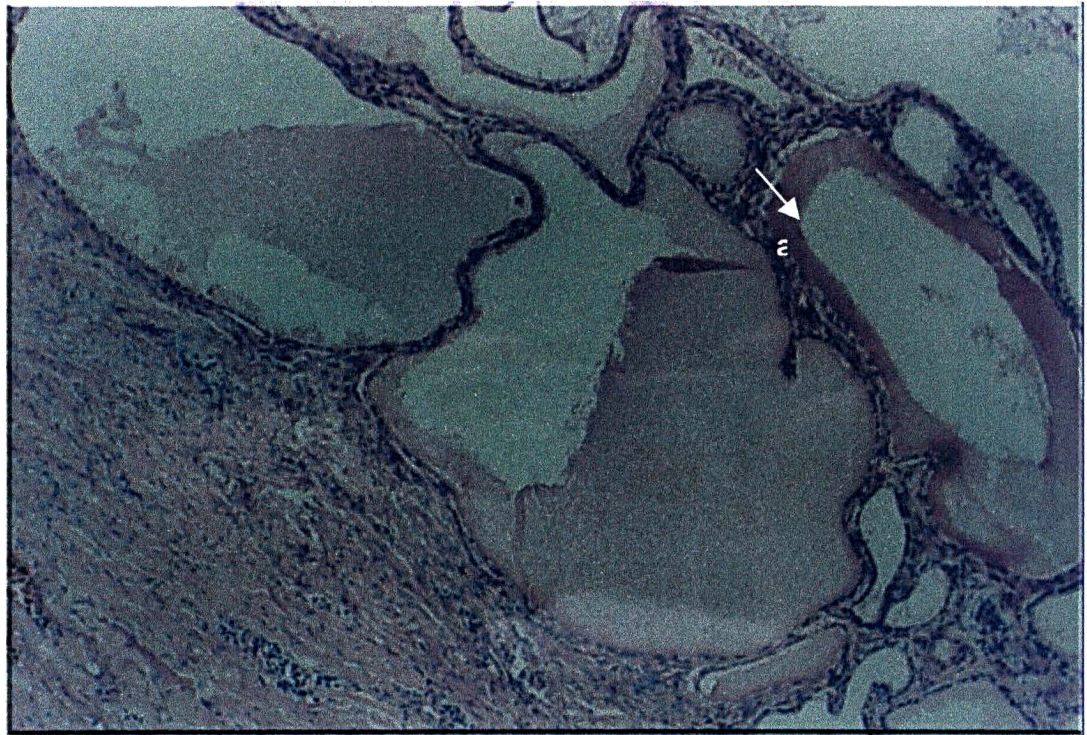
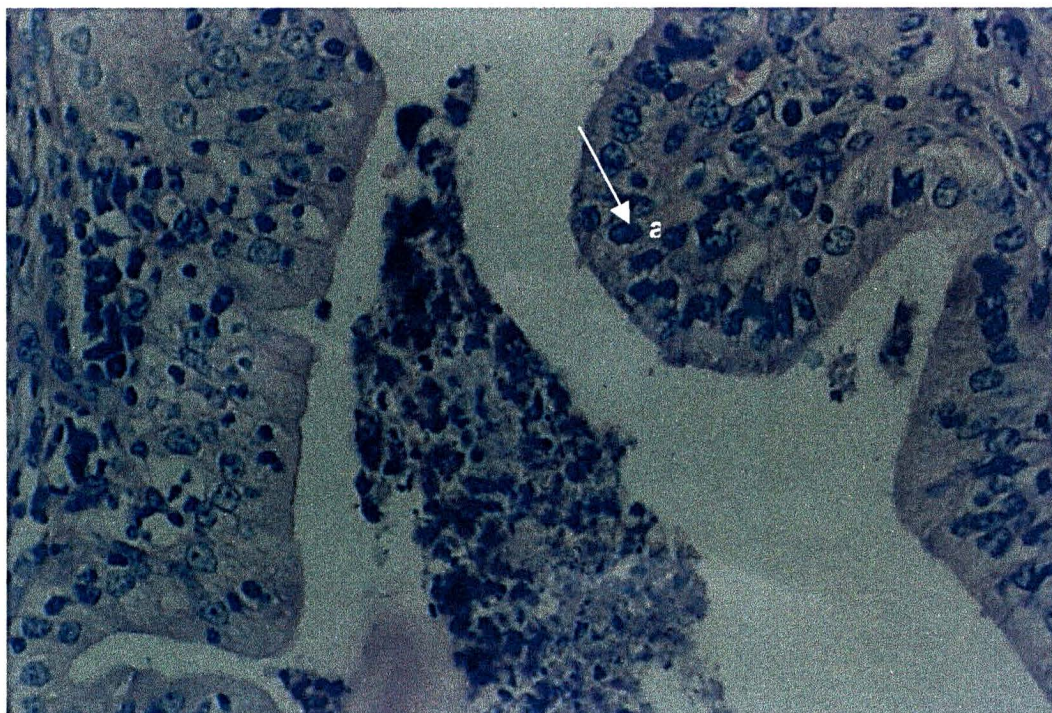


FIGURA 5 - PRESENÇA DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO MONONUCLEAR NO EPITÉLIO UTERINO, DE CADELAS (a), AUMENTO DE 40 VEZES.



Os resultados descritos nos QUADROS 5 e 6, comparam o grau de lesão histopatológica e os agentes bacterianos identificados.

QUADRO 5- COMPARAÇÃO ENTRE O HISTOPATOLÓGICO E A IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO DE CADELAS COM PIOMETRA ABERTA (n=23), ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA –PR, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A MAIO DE 2003.

Agente etiológico	Leve	Moderada	Acentuada	Endometrite
<i>Escherichia coli</i>	1	3	5	0
<i>Enterobacter spp.</i>	0	2	1	0
<i>Staphylococcus spp</i>	1	0	3	0
<i>Proteus spp.</i>	0	0	2	0
<i>Streptococcus spp.</i>	1	0	1	0
<i>Pseudomonas spp.</i>	0	1	1	0
<i>Citrobacter spp.</i>	1	0	0	0
Total	4	6	13	0

QUADRO 6- COMPARAÇÃO ENTRE O HISTOPATOLÓGICO E A IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO DE CADELAS COM PIOMETRA FECHADA (n=5), ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DE CURITIBA-PR, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A MAIO DE 2003.

Agente etiológico	Leve	Moderada	Acentuada	Endometrite
<i>Escherichia coli</i>	0	2	0	0
<i>Streptococcus spp.</i>	0	1	1	1
Total	0	3	1	1

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE COMPARAÇÃO ENTRE O TIPO DE PIOMETRA E O AGENTE ETIOLÓGICO.

Foram analisados os eventos independentemente uns dos outros, utilizando o teste do Qui-quadrado. A hipótese a ser testada foi a de que há ou não ligação entre a piometra aberta e o agente etiológico *Escherichia coli*. O teste do Qui-quadrado é realizado conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Qui-quadrado} = \sum[(\text{observado} - \text{esperado})^2 / \text{esperado}]$$

Com um alfa 0,01 (1% de significância) o Qui-quadrado para 1 grau de liberdade é de 6,64. Concluiu-se que há maior incidência de *Escherichia coli* nas piometras abertas do que nas fechadas, porém sem significância “estatística”.

4.4. DETERMINAÇÃO HORMONAL

TABELA 1- DOSAGENS HORMONAIS DE PROGESTERONA E ESTRADIOL DAS CADELAS COM PIOMETRA ABERTA (n=25), ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA-PR, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A MAIO DE 2003

AMOSTRA	PROGESTERONA	ESTRADIOL
	ng/mL	pg/mL
1	8,37	5,2
2	5,87	18,6
3	1,67	36,6
4	4,22	38,3
5	8,63	40
6	3,18	8,5
7	9,18	24,5
8	0,88	71,3
9	1,51	38,7
10	1,77	26,6
11	3,24	40,9
12	3,1	24,4
13	16,3	122
14	0,97	17,5
15	5,8	17,1
16	17,1	29
17	2,1	18
18	3,1	17,2
19	3,7	30,1
20	3,7	68,6
21	6,4	57,4
22	3,8	53,7
23	0,8	47,3
24	2,6	136
25	1,5	84,3
Média	4,77	42,87
Desvio Padrão	4,32	32,68

TABELA 2- DOSAGENS HORMONAIS DE PROGESTERONA E ESTRADIOL DAS CADELAS COM PIOMETRA FECHADA (n=5) ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA-PR, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 À MAIO DE 2003.

AMOSTRA	PROGESTERONA	ESTRADIOL
	ng/mL	pg/mL
1	2,21	62,1
2	7,34	62,1
3	22,1	91,3
4	3,84	18
5	30,4	48,1
Média	13,17	56,32
Desvio padrão	12,43	26,58

A análise estatística para comparação das médias foi feita utilizando-se o Programa Statistica for Windows e a análise pelo Teste de Duncan com um $p < 0,05$.

A análise para o estradiol nos dois grupos, mesmo com valores maiores nas piometras fechadas, não apresentou diferença estatística significativa.

Quanto à análise de progesterona os resultados obtiveram diferença significativa entre a piometra aberta e a fechada, sendo que a piometra fechada apresentou valores mais elevados de progesterona.

Apesar dos valores hormonais determinarem a fase do ciclo estral, existem variações individuais.

TABELA 3- CONCENTRAÇÕES SÉRICAS MÉDIAS (\pm EPM)* DE PROGESTERONA, ESTRADIOL E PROPORÇÃO ESTRADIOL/PROGESTERONA EM CADELAS DIAGNOSTICADAS COM PIOMETRA ABERTA OU FECHADA (n=30), ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA-PR.

TIPO DE PIOMETRA	PROGESTERONA (ng/mL)	ESTRADIOL (pg/mL)	PROPORÇÃO E2/P4
Aberta (n=25)	$4,8 \pm 0,9^a$	$43,0 \pm 6,5^a$	$18,0 \pm 4,2^a$
Fechada (n=5)	$13,2 \pm 5,5^b$	$56,3 \pm 11,9^a$	$9,4 \pm 4,8^{ab}$

* Letras sobrescritas diferentes, dentro de cada coluna, indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) para cada variável.

TABELA 4- CONCENTRAÇÕES SÉRICAS MÉDIAS (\pm EPM)* DE PROGESTERONA, ESTRADIOL E PROPORÇÃO ESTRADIOL/PROGESTERONA EM CADELAS COM PIOMETRA AGRUPADAS DE ACORDO COM O GRAU DE ALTERAÇÃO ENDOMETRIAL, ASSISTIDAS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA REGIÃO DE CURITIBA-PR.

HISTOPATOLOGIA	PROGESTERONA (ng/mL)	ESTRADIOL (E2)	PROPORÇÃO E2/P4
HCE leve (n=4)	1,6 \pm 0,5 ^a	28,0 \pm 9,0 ^a	26,4 \pm 11,9 ^a
HCE moderada (n=9)	5,7 \pm 1,6 ^{a,b}	52,4 \pm 13,0 ^a	18,7 \pm 7,2 ^a
HCE acentuada (n=15)	6,9 \pm 1,9 ^{a,b}	44,2 \pm 7,4 ^a	14,0 \pm 5,1 ^a
Endometrite (n=2)	12,1 \pm 10,0 ^b	54,6 \pm 36,6 ^a	6,3 \pm 2,2 ^a

* Letras sobrescritas diferentes, dentro de cada coluna, indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) para cada variável.

TABELA 5- COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS, SEGUNDO A ANÁLISE DE CLUSTER (K-MÉDIAS, COM K=4), COM A IDENTIFICAÇÃO E RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS, HISTOPATOLÓGICOS E HORMONAIS PARA OS INDIVÍDUOS PERTENCENTES A CADA UM DOS GRUPOS.

Grupo	Animal	Piometra	Agente Etiológico	Histopatologia	P4 (ng/mL)	E2 (pg/mL)	E2/P4
1	8	Aberta	<i>Proteus sp</i>	HCE acentuada	0,9	71,3	81,0
1	16	Aberta	negativo	HCE acentuada	16,3	122,0	7,5
1	29	Aberta	<i>Escherichia coli</i>	HCE moderada	2,6	136,0	52,3
1	30	Aberta	<i>Escherichia coli</i>	HCE moderada	1,5	84,3	56,2
2	3	Aberta	<i>Proteus sp</i>	HCE acentuada	1,7	36,6	21,9
2	4	Aberta	<i>Enterobacter sp</i>	HCE moderada	4,2	38,3	9,1
2	5	Aberta	<i>Escherichia coli</i>	HCE acentuada	8,6	40,0	4,6
2	9	Aberta	<i>Staphilococcus sp</i>	HCE leve	1,5	38,7	25,6
2	11	Aberta	<i>Escherichia coli</i>	HCE acentuada	1,8	28,8	16,3
2	13	Aberta	<i>Streptococcus sp</i>	HCE acentuada	3,2	40,9	12,6
2	28	Aberta	<i>Escherichia coli</i>	HCE leve	0,8	47,3	59,1
3	10	Aberta	<i>Staphilococcus sp</i>	HCE acentuada	3,7	68,6	18,5
3	12	Aberta	<i>Staphilococcus sp</i>	HCE acentuada	6,4	57,4	9,0
3	14	Aberta	<i>Escherichia coli</i>	HCE acentuada	3,8	53,7	14,1
3	19	Fechada	<i>Escherichia coli</i>	HCE moderada	2,2	62,1	28,1
3	25	Fechada	<i>Escherichia coli</i>	HCE moderada	7,3	62,1	8,5
3	26	Fechada	<i>Escherichia coli</i>	Endometrite	22,1	91,3	4,1
3	27	Fechada	<i>Streptococcus sp</i>	HCE acentuada	30,4	48,1	1,6
4	1	Aberta	<i>Enterobacter sp</i>	HCE acentuada	8,4	5,2	0,6
4	2	Aberta	<i>Staphilococcus sp</i>	HCE acentuada	5,9	18,8	3,2
4	6	Aberta	<i>Streptococcus sp</i>	HCE leve	3,2	8,5	2,7
4	7	Aberta	<i>Enterobacter sp</i>	HCE moderada	9,2	24,5	2,7
4	15	Aberta	<i>Pseudomonas sp</i>	HCE acentuada	3,1	24,4	7,9
4	17	Aberta	<i>Citrobacter sp</i>	HCE leve	1,0	17,5	18,0
4	18	Fechada	<i>Streptococcus sp</i>	HCE moderada	3,8	18,0	4,7
4	20	Aberta	<i>Escherichia coli</i>	HCE acentuada	5,8	17,1	2,9
4	21	Aberta	<i>Pseudomonas sp</i>	HCE moderada	17,1	29,0	1,7
4	22	Aberta	negativo	Endometrite	2,1	18,0	8,6
4	23	Aberta	<i>Escherichia Coli</i>	HCE moderada	3,1	17,2	5,5
4	24	Aberta	<i>Escherichia Coli</i>	HCE acentuada	3,7	30,1	8,1

Para a análise de agrupamento, foram definidos previamente quatro grupos, seguindo a classificação adotada para a avaliação histopatológica.

A análise para o estradiol nos dois grupos, mesmo apresentando valores maiores, não apresentou diferença significativa. Quanto a análise da progesterona os resultados obtiveram diferença significativa tanto para a piometra aberta como para a fechada.

5. DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO

Os resultados encontrados neste trabalho foram semelhantes aos primeiros trabalhos de CHAFFAUX et al. (1978), nos quais a *Escherichia coli* é a bactéria isolada com maior frequência. Assim como as pesquisas realizadas por DE BOSSCHERE et al. (2001). Todavia, não se pode deixar de considerar outros estudos como o de COCK et al. (1997), em que encontrou uma alta incidência de *Streptococcus. sp.*

WADAS et al. (1996) identificaram as mesmas bactérias descritas neste trabalho, pois se constata que a flora normal do trato reprodutivo da cadela é formada principalmente pela *Escherichia coli*, seguida pelo *Haemophilus spp*, *Streptococcus alfa hemolítico*, *Corynebacterium spp*, *Streptococcus canis*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacteróides spp*, *Pasteurella spp* e *Proteus mirabilis*.

A microflora uterina, durante o estro e proestro, é similar ao da vagina e cérvix. Estudos realizados por GILBERT (1992) identificaram as bactérias presentes no trato reprodutivo feminino patológico e concluíram que os microorganismos são os mesmos que se encontram na flora uterina normal. Posteriormente também confirmados pelos experimentos de DE BOSSCHERE et al. (2003) relatando a presença destes mesmos microorganismos na maioria das infecções do trato reprodutivo da fêmea canina.

JOHNSON et al.(2001) sugeriram que existe uma microflora presente no útero. Já NOMURA et al. (1988) discordaram desta afirmação, sugerindo que as bactérias podem entrar no útero, porém são rapidamente eliminadas. Neste trabalho, não houve detalhamento deste assunto, pois o material colhido foi após o procedimento cirúrgico, o que pode comprometer uma análise microbiológica.

CHEN et al. (2003) relataram que além desses microorganismos já citados, *Staphylococcus spp*, *Proteus spp* e *Pasteurella spp*, são encontrados, em menor frequência, os que também foram verificados no presente estudo.

Como se observa no QUADRO 3, *Streptococcus spp*, foi identificado, o que confirma com os estudos de HARDY e OSBORNE (2002), que descrevendo a ocorrência destes grupos de bactérias, pois estes elementos participam da flora normal do trato reprodutivo feminino.

Neste experimento, não foi comprovada a origem das *Escherichia coli*, pois não houve colheita de outras porções genitais do animal. Alguns autores relatam que a origem destes microorganismos seria do próprio intestino do animal. A justificativa para esta conclusão é de que as bactérias migram da região anal para o trato reprodutivo, fato este preconizado por HAGMAN e KUHN (2002).

As alterações das secreções uterinas devido à inflamação e anormalidades hormonais podem mudar a parede do útero predispondo-o a doenças reprodutivas. Além disso, os resíduos de açúcar nas membranas das células apicais são alvos para as bactérias. Os autores conjecturam que os hormônios esteróides poderiam facilitar a aderência das bactérias participando da patogênese da piometra (LEITNER et al. 2003).

Na análise dos dados dos exames bacteriológicos deste estudo, evidencia-se que a flora normal citada na literatura foi também identificada nas secreções uterinas colhidas dos animais com piometra deste experimento.

5.2 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

Os resultados obtidos, na avaliação histológica dos cornos uterinos, foram padronizados conforme a classificação modificada de DOW (1959), ilustrada no QUADRO 1.

A elevada infiltração de células inflamatórias observadas em algumas amostras, é justificada pelo trabalho de GILBERT (1992), em que foi descrita uma relação entre o tempo de infecção e a taxa de infiltração de células inflamatórias. Quanto maior o tempo de infecção maior a cronicidade da patologia e, portanto, maior infiltração de células inflamatórias.

Nos estudos de DHALIWAL et al. (1999), observaram-se alterações histopatológicas, semelhantes às encontradas neste trabalho, lesões inflamatórias

em todas as camadas do epitélio uterino, glândulas e os ductos glandulares distendidos, com deposição de fibrina e presença de células inflamatórias na sua maioria mononucleares e neutrófilos.

Histologicamente foi possível determinar, neste trabalho, 15 amostras com acentuada hiperplasia cística endometrial, 8 amostras com leve hiperplasia cística endometrial e 7 amostras com endometrite achados similares descritos por DOW (1959)

Com a imunohistoquímica utilizada nos recentes trabalhos de DHALIWAL et al. (1997) e DE BOSSCHERE et al. (2002), foi possível observar que a superfície epitelial uterina se torna espessada, as glândulas dilatadas e com infiltrações inflamatórias de elementos mononucleares. Neste experimento esta ferramenta investigativa não foi usada.

Na avaliação das células uterinas, em experimentos que procuraram induzir animais à hiperplasia cística endometrial, obtiveram-se resultados semelhantes aos normalmente encontrados em animais com piometra com variação de graus (leve, moderada e acentuada) de hiperplasia cística endometrial (DE BOSCHERE et al. 2002).

COCK et al. (1997) observaram uma grande variabilidade nos diferentes estágios do ciclo estral da cadela com alterações que consistem em metaplasia escamosa da superfície epitelial e cripta, em que houve o aparecimento de hiperplasia e dilatação das glândulas endometriais, infiltração mononuclear de moderada a severa circundando a lâmina própria, miométrio fino e atrófico, similares aos achados deste experimento.

5.3 EXAME DA DOSAGEM HORMONAL

Na TABELA 2 são apresentados os resultados das dosagens hormonais de progesterona e estradiol. Observa-se uma grande variabilidade dos resultados, pois os hormônios esteróides variam durante as fases do ciclo estral.

Os resultados descritos por COCK et al. (1997) ressaltaram que não é apenas a progesterona a responsável pelo desenvolvimento do complexo da hiperplasia cística endometrial, mas uma disfunção dos receptores de esteróides.

Nos estudos realizados por SILVA et al. (1995), observa-se que a abertura da cérvix no proestro ocorreu 2 a 3 dias antes do pico de LH, concomitantemente a progesterona e o estradiol com valores $2,0 \pm 2,4$ n.mol l⁻¹ e $171,1 \pm 133,1$ pmol l⁻¹. Estes resultados não puderam ser comparados com o presente estudo, pois o LH não foi dosado. Sugerem-se estudos específicos para estabelecer alguns valores que possam estar relacionados com a abertura ou não da cérvix, no caso da piometra aberta ou fechada.

Dos 30 casos estudados, encontraram-se 5% de piometras fechadas e 95% de piometras abertas, o que é similar ao trabalho desenvolvido por ALVARENGA et al. (1995).

As pesquisas realizadas por MEMON et al. (1993) não observaram descarga vaginal em 15% dos animais com piometra, sendo similar aos resultados observado neste estudo.

Os mesmos autores acima relataram que existe um grande risco do desenvolvimento de septicemia e endotoxemia. Nesses casos, os animais chegam às clínicas veterinárias prostrados e com necessidade de atendimento emergencial, o que também foi observado neste trabalho.

Comparando as diferenças significativas demonstradas pela análise de Cluster, enfatiza-se a interferência da progesterona na piometra fechada. Não foi possível comparar com outros estudos, pois a literatura consultada não cita informações a este respeito.

Todavia, DE BOSSCHRE et al. (2001) enfatizam que existe uma necessidade de estudos complementares para correlacionar as diversas alterações com o tipo de piometra.

Nota-se que neste estudo houve uma baixa porcentagem de piometra fechada, relato similar ao trabalho de GILBERT (1992).

Este estudo caracterizou-se pela diversidade de resultados, tanto para o tipo de agente etiológico, quanto para as lesões uterinas e valores hormonais, relacioná-los estatisticamente seria necessário um grande número de amostras.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- a *Escherichia coli* foi a bactéria isolada em 36% das amostras;
- os exames histopatológicos revelam uma variação nos graus de hiperplasia cística endometrial, sendo que a hiperplasia cística endometrial de grau I é encontrada em 50 % das amostras;
- há variação significativa na proporção de progesterona e estradiol entre a piometra aberta e fechada com valores de $18,0 \pm 4,2$ para a piometra aberta e $9,4 \pm 4,8$ para a piometra fechada com um $p < 0,05$;
- não foi possível relacionar as lesões teciduais, o agente etiológico e as determinações hormonais do estradiol e da progesterona com o tipo de piometra aberta e fechada.

REFERÊNCIAS

ALLEN, W. E., DAGNALL, G. J. R. Some observations on the aerobic bacteria flora of the genital tract of the dog and bitch. **Journal of Small Animal Practice**, London, n. 23, p.325-335, 1982.

ALVARENGA, F. C.L., BICUDO, S.D., PRESTES, N.C., FERREIRA, J.P., LIMA, M.C.C., FUCK, E.J., TAVARES, C.V.N., LOPES, M.D., OBA, E. Diagnostico ultrasonográfico de piometra em cadelas, **Brazil Journal Veterinary Residence Animal Science**. São Paulo, v. 32, n. 2, p. 105-108, 1995.

BABSON, A.L., The immulite automated immunoassay system. **Journal Clinical Immunoassay**, Wayne, n. 14, p. 83-88, 1991.

BLENDIGER, K., BOSTEDT, H., HOFFMANN, B. Hormonal state and effects of the use of an antiprogesterin in bitches with pyometra. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, n. 51, p. 317-325, 1997.

CHAFFAUX, S., PERSON, J.M., RENAULT, L. Étude bactériologie de l'infection utérine des carnivores domestiques. **Recueil de Médecine Veterinaire**. Cedex n-154, v-5, p. 465-471, 1978.

CHEN, Y.M., WRITH, P. J. , LEE, C.S., BROWING, G. F., Uropathogenic virulence factors in isolates of Escherichia coli from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 1: p. 57-69, 2003.

COCK, H., VERMEIRSCH, H., DUCATELLE, R., SCHEPPER, J. Immunohistochemical analysis of estrogen receptor in cystic-endometritis-pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**, New York, n. 48, p. 1035-1047, 1997.

COCKCROFT, P. D. Focal cystic endometrial hyperplasia in a bitch. **Journal of Animal Practice**, London, n. 36. p. 77-78, 1995.

CONCANNON, P. W., McCANN, J.P., TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, n. 39, p. 3-25, 1989.

COX, J. Progestagens in bitches a review. **Journal Small Animal Practice**, London, n.11, p. 759-779, 1970.

DE BOSSCHERE, H., DUCATELLE, R., VERMEIRSCH, H., SIMOENS, P., CORYN, M. Estrogen-alpha and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, n. 70, p. 255-259, 2002.

DE BOSSCHERE, H., DUCATELLE, R., VERMEIRSCH, H., VAN DER BROECK, W., CORYN, M. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch should the two entities be disconnected. **Theriogenology**, New York, n.55, p. 1509-1519, 2001.

DHALIWAL, G. K., ENGLAND, G.C.W., NOAKES, D. E. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptors in the uterus of the normal bitch during oestrus and metoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**. Cambridge, n. 51, p. 167-176, 1997.

DHALIWAL, G. K., ENGLAND, G.C.W., NOAKES, D. E. The influence of exogenous steroid hormones on steroid receptors, uterine histological structure and the bacterial flora of the normal bitch. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, n. 56, p. 259-277, 1999.

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

EDWARDS, P. R., EWING, W.H., Identification of enterobacteriaceae. 3. ed., Minneapolis, Burgess, p. 362, 1972.

ENGLAND, G., EGER, A., CONCANNON, W. Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch. **Recent Advances in Small Animal Reproduction International Reproductive Information**, 2003. Ithaca NY. Disponível em: <http://www.ivis.org>. Acesso: 31/07/2003.

ENGLAND, G., LOFSTEDT, R. Clinical use of prostaglandins in bitches. In: **Canine Reproduction Seminar**, Atlantic veterinary college, Canada, 2000.

FELDMAN E. C., NELSON, R. W., **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**, Philadelphia, E. B. Saunders, 1987.

FELDMAN, E. C., NELSON, R. W. Pyometra. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. Philadelphia, v. 16, n. 3, p.561-576, 1986.

FELDMAN, E.C., NELSON, R. W., **Canine and Feline Endocrinology and reproduction**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 399-417, 1996.

FRANSON, B., LAGERSTEDT, A. S., HELLMEN, E., JOHNSON, P. Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine diseases. **Journal Veterinary Medicine**. Berlin, n. 44, p. 417-426, 1997.

GALABOVA, G., EGERBACKER, M., AURICH, J. E., WALTER, I., Morphological changes of the endometrial epithelium the bitch during metaestrus and anestrus. **Reproduction Domestic Animals**, Berlin, n. 38, p. 1-6, 2003.

GANDOTRA, V. K., SINGLA V. K., KOCHHAR, H. P. S., CHAUHAN, F. S., DWIVEDI. Haematological and bacteriological studies in canine pyometra. **Indian Veterinary Journal**, Chennai, n. 71, p. 816-818, 1994.

GILBERT, R. Diagnosis and treatment of pyometra in bitches and queens. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian Small Animal**, Philadelphia, v.14, n. 6, p.771-784. 1992.

GOBELLO, C., CASTEX, G., KLIMA, L., RODRIGUEZ, R., CORRADA, Y. A study of two protocol combining aglepristone and cloprostenol to treat open cervix pyometra in the bitch. **Theriogenology**, New York. n. 8897, p. 1-8, 2003.

GOBELLO, C., SOTA, R. L., GOYA, R.G., A review of canine pseudocyesis. **Blackwell Synergy**, v.36, n.6, p. 283-286, 2001. Disponivel em: <http://www.blackwell-synergy.com/>. Acesso em: 12 dez. 2002.

GOODMAN, M. Ovulation timing. **Veterinary Clinics of North America: Animal Practice**, Philadelphia, v. 31, n-2, p-219-235, 2001.

HAGMAN, R. M., KUHN, I. *Escherichia coli* from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, n. 84, p. 143-153, 2002.

HADLEY, J. C., The development of cystic endometrial hyperplasia in the bitch following serial uterine biopsies. **Journal of Small Animal Practice**, London, n. 16, p.247-257, 1975.

HARDY, R. M., OSBORNE, C. A. Canine pyometra pathophysiology, diagnosis and treatment of uterine and extra-uterine lesions. **Journal American Animal Hospital Association**, Lakewood, n.10, p. 245-268, 1974.

HOLST, B. S., LARSSON, B., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., LAGERSTEDT, A.S., LINDE-FORSBERG, C., Prediction of the recovery rate in the bitch. **Journal of Veterinary Medicine**, Series a, Sweden, v. 48, n. 10, p. 587-593, 2001.

HOLST, P., PREMISTER, R., D., Temporal sequences in the estrus cycle of the bitch. **American Journal Veterinary Research**, Sweden, v. 36, n. 5, p. 194-206, 1971.

JENSEN, A. L., BANTZ, M., POULSEN, D., ARESTRUP, F. Cystic endometrial hyperplasia / pyometra complex in the dog. **European Journal of Company Animals Practice**. [S.l.], n. 4, p.16-20, 1984.

JOHNSON, J.R., DELAVARI, P., KUSKOWSKI, M., GAASTRA, W. Phytogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. **Journal Infection Disease**. Minesota, v. 15, n.183, p. 897-906, 2001.

KENNEDY, P. C., MILLER, R. B. The female genital system. **Pathology of Domestic Animals**. 4th edn. Ed. K.F.V. Jubb. P. C. Kennedy and A.C. Palmer Academic Press. London, p. 349-470, 1992.

KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W.M. HERECKENBERGER, P.C., INN, R.W.C. **Diagnóstico Microbiológico**: Texto e Atlas Colorido Ed Medsi 5ªed São Paulo, 2001.

KOOISTRA, H.S., OKKENS, A. C., BEVERS, M., POPP-SNIJDERS, C., HAAFTE, B.V., DIELEMAN, S., SCHOEMAKER, J., Concurrente pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrus cycle and anestrus in beagles bitches. **Biology of Reproduction**. London, n. 60, p. 65-71, 1999.

KUSTRITZ, M. V. R. Theriogenology question of the month. **Journal American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 220, n. 2, p.165-167, 2002.

KUSTRITZ, M. V. R. Use of commercial luteinizant hormone and progesterone assay kits canine breeding management, **Recent Advances in Small Reproduction**. Ithaca NY, 2001. Disponível em : [http:// www.ivis.org](http://www.ivis.org). Acesso: 31/07/2001.

KUTZLER, A. M., MOHAMMED, H.O., LAMB, S.V., VICKI, N., MEYERS, W. Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. **Theriogenology**, New York, 2003. Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso: 20/10/2003.

LACROIX, C., RAMIREZ, R. Eventos endócrinos del ciclo estral de la perra y fármacos utilizados como anticonceptivos y abortivos. **Ammvepe**. México, v-12, n-1, p.6-9, 2001.

LANGE, K., GUNZEL-APPEL, A. R., HOPPEN, H.O., MISCHKE, R., NOITE, F. Effects of low dose prostaglandin F2 α during the early luteal phase before and after implantation in beagle bitches. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. London, n. 51, p. 251-257, 1997.

LEITNER, M., AURICH, J. E., GALABOVA, J. E., AURICH, C., WALTER, I., Lectin binding patterns in normal canine endometrium and in bitch with pyometra and cystic endometrial hyperplasia. **Histological Histopathology**, Murcia, n.18, p.787-795, 2003.

MEMON, M. A., MICKELSEN, D. Diagnosis and treatment of closed-pyometra in a bitch, **Journal of Small Animal Practice**, London, n. 4, p. 509-512, 1993.

MUNSON, L., GARDNER, I. A., MASON, R. J., CHASSY, M. L., SEAL, U. S., Endometrial hyperplasia and mineralization in zoo felids treated with melengestrol acetate contraceptives. **Veterinary Pathology**, Washington, DC n.39, p. 419-427, 2002.

NASCIMENTO, E. F., MARCHEVSKY, R. S., CHQUILO, M. A. G., Alterações morfológicas no ovário e corno uterino da cadela. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 38, n. 6, p. 881-888, 1986.

NASCIMENTO, F. E., SANTOS, R. L., **Patologia da reprodução dos animais domésticos**, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p. 44-63, 1997.

NOMURA, K., Canine pyometra with cystic endometrial hyperplasia experimental inuced by *Escherichia coli* inoculation. **Japan Journal Science**. [S.I.], n. 45, p. 237-240, 1983.

OLSON, P., HUSTED, P. W., ALLEN, T., NETT, T. Reproductive endocrinology and physiology of the bitch and queen. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.14, n. 4, 1984.

QUINN, M. E., CARTER, M. E., MARKEY, B., CARTER, G. R., **Clinical Veterinary Microbiology**, London, Wolfe Publishing, p. 648, 1994.

ROMAGNOLI, S., Canine pyometra: pathogenesis, therapy and clinical cases. **27 Wsava- Whalthan International Award for Scientific Achievement Congress**. Amsterdam, p.1-5, 2000.

SILVA, L. D. M., ONCLIN, K., VERSTEGEN, J. P. Cervical opening in relation to progesterone and oestradiol during heat in the beagles bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, n. 104, p. 85-90, 1995.

SOKOLOWSKI, J. H. Reproductive patterns in the bitch. Symposium on problems. **Veterinary Clinics of North América**, Philadelphia v. 7, n. 4, p.653-657, 1973.

WADAS, B., KÜHN, I., LAGERSTEDT, A., J TSI ONSSON, P. Biochemical phenotypes of *Escherichia coli* in dogs: Comparison of isolates isolated from bitch suffering from pyometra and urinary tract infection with isolates from faeces of healthy dogs. **Veterinary Microbiology**, Uppsala, Sw, n.52, p. 293-300, 1996.

WATTS, J.R., WRIGHT, P. J., PARRY, B. W. Sodium cloprostenol administered at a continuous low dosage induces polydipsia and supresses luteal function in early dioestrus bitches. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, n. 67, p.113-123, 2001.

WRIGHT, P. J., PARRY, B. W., Cytology of the canine reproductive system. **Veterinary Clinics of North America**, Philadephia, n. 19, p. 851-873, 1989.-