

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DA CITOLOGIA ENDOMETRIAL EM CADELAS CLINICAMENTE
SAUDÁVEIS DURANTE AS FASES DO CICLO ESTRAL E COM PIOMETRA**

Beatryz Fonseca Da Silva
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS – BRASIL

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DA CITOLOGIA ENDOMETRIAL EM CADELAS CLINICAMENTE
SAUDÁVEIS DURANTE AS FASES DO CICLO ESTRAL E COM PIOMETRA**

Beatryz Fonseca Da Silva

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS – BRASIL

Dezembro 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S586c Silva, Beatryz Fonseca da, 1988-
2013 Avaliação da citologia endometrial em cadelas clinicamente saudáveis durante as fases do ciclo estral e com piometra / Marina Cruvinel Assunção Silva. – 2013.
41 f. il.
- Orientador: João Paulo Elsen Saut.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Endométrio - Citologia - Teses. I. João Paulo Elsen Saut. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo agradeço a Deus pela minha vida, de minha família, amigos e pela oportunidade de ser uma pessoa saudável para batalhar pelos meus objetivos.

Agradeço enormemente aos meus pais Raimundo Pereira da Silva e Elza Fonseca Melo da Silva por serem minhas âncoras, meus exemplos de dignidade, respeito e por acreditarem e investirem em minha formação. Como meu pai sempre diz: eu acredito no seu talento.

Aos meus irmãos Braynna e Rômulo pelo apoio, incentivo, amizade e conselhos.

Agradeço também a minha Soul Mate (Adelson) pela compreensão, paciência e incentivo.

Ao meu orientador Professor João Paulo Elsen Saut pela oportunidade, confiança, paciência, respeito, humildade e dedicação às pesquisas. Por ser um exemplo de profissional. E por mostrar que pesquisas começam por conhecimentos básicos e que através desta podemos mudar conceitos.

Ao meu coorientador Professor Francisco Cláudio Dantas Mota pelas orientações, dedicação, paciência e direcionamento.

A professora Alessandra Aparecida Medeiros pelas orientações e ensinamentos.

Agradeço também a todos que colaboraram ao desenvolvimento do trabalho: Raquel, Nicole, Thales, Ângela, Lara, Thaísa e Plínio. Faço um agradecimento especial ao Igor que sempre esteve disposto a auxiliar e por simplesmente ser essa pessoa generosa e dedicada.

Aos funcionários do Hospital Veterinário, Marco Túlio, Nilson, Lucimar, Marli, Solange e João, por serem pessoas maravilhosas e sempre dispostas a colaborar.

Aos professores: Daise Aparecida Rossi, Ricarda Maria dos Santos, Terezinha, Cirilo Antônio de Paula Lima, José Octávio Jacomini e Antônio Vicente Mundim pela colaboração.

E por fim agradeço à Universidade Federal de Uberlândia e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela possibilidade da realização do meu mestrado.

SUMÁRIO

	Página
1.INTRODUÇÃO.....	9
1.1.Objetivos.....	10
1.1.1.Geral.....	10
1.1.2. Específicos.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 Imunidade uterina.....	10
2.2. Microbiologia uterina.....	12
2.2.1. Flora residente.....	12
2.2.2. Microbiologia da Piometra.....	14
2.3. Piometra e Complexo de Hiperplasia Endometrial Cística.....	14
2.3.1. Etiopatogenia.....	16
2.3.2. Sinais clínicos.....	18
2.3.3. Alterações laboratoriais.....	20
2.3.4. Alterações histopatológicas.....	22
2.3.5. Diagnóstico por imagem.....	22
2.3.6. Biópsias endometriais.....	23
2.3.7. Citologia endometrial.....	23
2.3.8. Tratamento e prognóstico.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Delineamento experimental.....	28

3.2. Animais e Local de execução.....	28
3.3. Avaliação Macroscópica.....	29
3.3. Isolamento Bacteriano.....	29
3.4 Citologia Endometrial.....	30
3.4. Análise histopatológica.....	30
3.5. Análise Estatística.....	31
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	31
4.1. O ciclo estral influencia na citologia endometrial.....	32
4.2. O isolamento bacteriano uterino interfere na citologia endometrial em cadelas clinicamente saudáveis e sem alterações histológicas.....	33
4.3. A hiperplasia endometrial cística não interfere na citologia endometrial de cadelas.....	35
4.4. A piometra interfere na citologia endometrial.....	36
5. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Caracterização da citologia endometrial de cadelas sadias classificadas de acordo com a fase do ciclo estral.....	32
Figura 2: Comparação da citologia endometrial de cadelas sem isolamento bacteriano e histologia normal com cadelas em durante as fases ciclo estral.....	34
Figura 3: Citologia endometrial de cadelas com e sem HEC.....	36
Figura 4: Influência da piometra na citologia endometrial de cadelas.....	37
Figura 5: Citologia endometrial de cadelas: (A) Clinicamente saudáveis e sem enfermidades uterinas com presença de células do epitélio endometrial; (B) Piometra com a presença de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células do epitélio endometrial. Aumento de 40. Coloração Panótico Rápido.....	38
Figura 6: Classificação histopatológica do útero de cadelas com piometra de acordo com Dow (1958) adaptada por Weisser (2004) e com o útero normal; (A1) Classificação acentuada aumento 10; (A 2) aumento de 40; (B) Classificação moderada aumento de 10; (C) Classificação Leve aumento de 10; (D1) útero normal sem alterações histológicas aumento 10 (D2) aumento de 40. Coloração de Hematoxilina e Eosina.....	39

AVALIAÇÃO DA CITOLOGIA ENDOMETRIAL EM CADELAS CLINICAMENTE SAUDÁVEIS DURANTE AS FASES DO CICLO ESTRAL E COM PIOMETRA

RESUMO: Com o objetivo de avaliar a influência do ciclo estral, isolamento bacteriano, hiperplasia endometrial cística (HEC) em cadelas clinicamente saudáveis e sem enfermidades uterinas e com piometra no exame de citologia endometrial, foram utilizadas 105 cadelas saudáveis e 33 com piometra. Todos os animais realizaram ovariosalpingohisterectomia e os úteros avaliados macroscopicamente e colhido amostras para avaliação microbiológica, histológica e citologia endometrial pela técnica de escova endometrial (*cytobrush*). A fase de anestro apresentou diferença na porcentagem de neutrófilos e células do epitélio endometrial. A citologia endometrial de cadelas sem alterações histológicas e isolamento bacteriano, de acordo com a fase do ciclo estral, foram as seguintes: a) proestro (neutrófilos 2,05 + 0,64%; eosinófilo 0,07 + 0,07%; células de descamação 97,87 + 0,63%), b) estro (neutrófilos 4,55 + 1,76%; eosinófilo 0,83 + 0,83; células de descamação 94,62 + 1,83) c) diestro (neutrófilos 7,87 + 4,07%; células de descamação 92,13 + 4,07%) e d) anestro (neutrófilos 0,24 + 0,24%; células de descamação 99,75 + 0,24%). Houve aumento da porcentagem de neutrófilos e células de descamação na fase de proestro dos animais com isolamento bacteriano. A presença da piometra interferiu no aumento de neutrófilos (60,30 + 4,32%) e linfócitos (1,71 + 0,52%). Os neutrófilos foram os leucócitos mais encontrados em todas as avaliações citológicas. Concluiu-se que a citologia endometrial é uma ferramenta útil no conhecimento das variações citológicas e que a fase do ciclo estral influencia a citologia endometrial. A hiperplasia endometrial cística e o isolamento bacteriano não interferem na citologia endometrial. A piometra influencia a citologia endometrial independente da classificação das alterações histológicas, sendo os neutrófilos as células mais presentes.

Palavras- chave: *Canis familiaris*, células inflamatórias, *cytobrush*, imunidade uterina, piometra

EVALUATION ENDOMETRIAL CYTOLOGY OF THE NORMAL BITCH THROUGHOUT THE REPRODUCTIVE CYCLE AND WITH PYOMETRA

ABSTRACT: In order to assess the influence of the estrous cycle, bacterial isolation, cystic endometrial hyperplasia (HEC) in clinically healthy and without uterine diseases and pyometra in the examination of endometrial cytology bitches, 105 healthy and 33 bitches with pyometra were used. All animals underwent ovariohysterectomy and uteri macroscopically assessed and collected samples for microbiological evaluation, endometrial histology and cytology technique for endometrial brush (cytobrush) . The phase of anestrus showed difference in the percentage of neutrophils and endometrial epithelial cells. The bitches endometrial cytology and no histologic changes bacterial isolation in accordance with the phase of the estrous cycle were as follows: a) proestrus (neutrophils $2,05 \pm 0,64\%$, eosinophils $0,07 \pm 0,07\%$; endometrial epithelial cells $97,87 \pm 0,63\%$), b) estrus (neutrophils $4,55 \pm 1,76\%$, eosinophils $0,83 \pm 0,83$, endometrial epithelial cells $94,62 \pm 1,83$) c) diestrus (neutrophils $7,87 \pm 4,07\%$; endometrial epithelial cells $92,13 \pm 4,07$) and d) anestrus (neutrophils $0,24 \pm 0,24\%$; endometrial epithelial cells $99,75 \pm 0,24\%$). There was an increase in the percentage of neutrophils and endometrial epithelial cells in the proestrus phase of the animals with bacterial isolation. The pyometra interfere with presence of neutrophils increased ($60,30 \pm 4,32\%$), and lymphocytes ($1,71 \pm 0,52 \%$). Neutrophils were more leukocytes found in all cytological evaluations. It was concluded that endometrial cytology is a useful tool in knowledge of cytological changes and the phase of the estrous cycle influence the endometrial cytology. Cystic endometrial hyperplasia and bacterial isolation do not interfere in endometrial cytology. The independent influences pyometra endometrial cytology classification of histological changes, and neutrophils cells more gifts.

Key-words: *Canis familiaris*, inflammatory cells, cytobrush, immunity uterine, pyometra

1. INTRODUÇÃO

A integridade do sistema reprodutivo é fundamental para a reprodução animal, visto que modificações no microambiente uterino ocasionadas por processos inflamatórios, hiperplásicos ou neoplásicos são importantes causas de infertilidade e mortalidade (FOSTER, 2009). Dentre as doenças uterinas, a piometra é a desordem mais relatada e importante que acomete cadelas inteiras, na maioria nulíparas, normalmente diagnosticadas entre 1 a 4 meses após o cio e, de particular importância na clínica–cirúrgica uma vez que pode evoluir para o choque endotóxico e morte (SMITH, 2006; PRETZER, 2008).

Piometra é definida como o acúmulo de conteúdo purulento no lúmen uterino, com alterações histológicas de variados graus de infiltrados inflamatórios no endométrio e nos casos mais graves no miométrio. Geralmente se manifesta durante ou após o período de predominância progesterônica (DOW, 1959; FELDMAN; NELSON, 2004). Egenvall et al. (2001), ao analisarem o banco de dados de seguro da Suécia verificaram que cerca de 25% da população de cadelas não castradas desenvolveram a doença antes dos 10 anos.

Segundo Bartoskova et al. (2012) a imunidade uterina local tem contribuição no desenvolvimento da piometra. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores que ascendem o trato genital feminino após a abertura cervical (HERATH et al., 2009; CHAPWANYA et al., 2013). Polimorfonucleares derivados do sangue são as principais células responsáveis pela remoção bacteriana (SHELDON, et al., 2009).

A aplicação de técnicas para quantificar a celularidade normal e patológica do endométrio pode ser usada na compreensão dos mecanismos de defesa do sistema reprodutivo. Em muitas espécies como a bovina, equina e inclusive em humanos, a citologia endometrial é considerada o método de referência para o diagnóstico citológico de endometrites (BARAŃSKI et al., 2012; COCCHIA et al., 2012).

Dentre as técnicas de citologia endometrial, a escova endometrial (*cytobrush*) destaca-se de outros métodos devido à facilidade, viabilidade e tempo de obtenção das amostras, além de maior celularidade com baixo grau de distorção celular (COCCHIA et al., 2012).

Apesar da grande quantidade de informações relativas à imunidade inata e adaptativa no trato genital feminino, há poucos relatos sobre a quantidade de células

leucocitárias no endométrio canino em comparação a vacas, porcas e éguas (BARTOSKOVA et al., 2012).

1.1.OBJETIVO

1.1.1. GERAL

Avaliar a citologia endometrial de cadelas com piometra e clinicamente saudáveis e sem desordens uterinas durante as fases do ciclo.

1.1.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar se há influência do ciclo estral na interpretação da citologia endometrial;
- Determinar as células predominantes na citologia endometrial;
- Identificar as alterações citológicas na presença e ausência de bactérias;
- Determinar a possível relação da hiperplasia endometrial cística na citologia endometrial;
- Determinar a possível relação da classificação das alterações histológicas de Dow (1959) adaptada por Weiss (2005) com a citologia endometrial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Imunidade uterina

O sistema reprodutivo feminino apresenta mecanismos imunológicos para protegê-lo contra patógenos invasores. O sistema imunológico tem sido tradicionalmente dividido em imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata é a mais universal, mais rápida e essencial para controlar a homeostase uterina

(CHOTIMANUKUL; SIRIVAIIDYAPONG, 2011). A resposta imunológica do útero é fornecida por células imunes do endométrio e por células endometriais do estroma e epitélio (SHELDON et al., 2009).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo, sendo formada por células epiteliais que funcionam como barreira física para evitarem a invasão e fixação de micro-organismos. Altas expressões de interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-10), fator de necrose tumoral (TNF) e *toll like receptor* (TLR4) no endométrio comprovaram o seu papel de vigilância no mecanismo de defesa do hospedeiro e na formação da imunidade local. O sistema de defesa uterina tem que ser bem específico, pois ao mesmo tempo em que responde a estímulos patogênicos deve propiciar ambiente adequado à reprodução (FOSTER, 2009; BARTOSKOVA et al., 2012; CHAPWANYA et al., 2013).

Os hormônios sexuais modificam o microambiente uterino por promover o influxo e a localização de células de defesa no endométrio. Em ratos durante a fase folicular ocorre invasão de leucócitos, enquanto, que a fase lútea está associada à supressão das respostas imunes (CHOTIMANUKUL; SIRIVAIIDYAPONG, 2011).

Os neutrófilos constituem as principais células fagocitárias e estes são recrutados da circulação periférica para o lúmen uterino em resposta a agentes patogênicos (FOSTER, 2009). A piometra é uma síndrome associada com o recrutamento de leucócitos, comumente relatada em cadelas, sendo a principal doença do sistema reprodutivo (BARTOSKOVA et al., 2012).

A presença da imunidade uterina local e seu mecanismo de resposta, sem dúvida, desempenham um papel importante no desenvolvimento da piometra. Pouco se conhece sobre as células imunes no útero canino, diferentemente das outras espécies como bovinos, suínos e equinos (BARTOSKOVA et al., 2012). O estudo realizado por Watts, Wrigth e Lee (1998) em cães trouxe uma visão geral sobre as variações na citologia endometrial de cadelas com úteros normais durante as fases do ciclo estral, enquanto Groppetti et al. (2010) abordaram em condições patológicas, como a piometra.

A compreensão dos fatores de risco para as enfermidades uterinas, sua resposta frente a agentes infecciosos e como sua função se altera após esses desafios é imprescindível para a o entendimento das patogenias e tratamentos de suas patologias (SHELDON et al., 2009).

2.2. Microbiologia uterina

2.2.1. Flora residente

A existência de flora bacteriana residente no útero ainda está indefinida. Os estudos não convergem sobre a presença, frequência e estágios do ciclo reprodutivo mais susceptível à existência de bactérias. Sabe-se que a fase do ciclo estral e a permeabilidade cervical influenciam o desenvolvimento destas no útero de cadelas clinicamente saudáveis (WATTS; WRIGHT; WHITHEAR, 1996; SCHULTHEISS et al., 1999; MAKSIMOVIC et al., 2013).

Um dos primeiros trabalhos realizados para isolar e identificar bactérias do útero de cadelas sem uteropatias foi realizado por Olson e Mather (1978). Estes autores sugeriram que o útero de cadelas clinicamente saudáveis normalmente não contém bactérias aeróbicas. Contudo, Schultheiss et al. (1999) e Maksimovic et al. (2012) concluíram que bactérias podem ser isoladas no útero canino durante todas as fases do ciclo estral, sendo maior durante o diestro e, normalmente, estas não correspondem a flora residente vaginal.

Baba, Furkata e Arakawa (1983) ao avaliarem 78 amostras uterinas 48 apresentaram isolamento de microorganismos, tais como estafilococos e micoplasma. Além disso, observaram semelhança nas microfloras uterinas e vaginais, pois algumas amostras continham um único isolado identificado, e que raramente causavam infecções uterinas.

Watts, Wright e Whithear (1986) sugeriram que o útero apresenta uma microflora nos períodos de proestro e estro. Visto que a maioria das bactérias foram isoladas nesta fase e que estas são semelhantes às encontradas na vagina e cérvix. Schultheiss et al. (1999) isolaram bactérias em 9/26 de cadelas pré-púberes e 6/16 cadelas no diestro, sendo que as menores taxas de isolamento corresponderam ao estro, anestro e durante a gestação. De 106 animais clinicamente saudáveis, 21 apresentaram isolamento bacteriano, com isso concluiu-se que estes microorganismos faziam parte da flora residente normal, especialmente em cães pré-púberes e na fase do diestro.

As principais bactérias isoladas a partir de cadelas sem doenças uterinas foram: *E. coli*, *Haemophilus ssp*, *Streptococcus spp*, *Corynebacterium sp.*, (WATTS; WRIGHT; WHITHEAR, 1996; MAKSIMOVIC et al., 2013), *Alcaligenes faecalis*,

Pasteurella spp., *Proteus mirabilis* (WATTS; WRIGHT; WHITHEAR, 1996); *Bacillus* sp., *Clostridium perfringens* (CARNEIRO; TONIOLLO; SCHOCKEN-ITURRINO, 2005); *Staphylococcus* spp. (coagulase negativo), *Staphylococcus pseudintermedius*, *Micrococcus*, *Sarcina*, Micro-organismos como as leveduras também foram isoladas no útero de cadelas saudáveis (DHALIWAL; WRAY; NOAKES, 1998).

2.2.2. Microbiologia da Piometra

A piometra é caracterizada por processo inflamatório em que ocorre o acúmulo de pus no lúmen uterino, cuja principal bactéria envolvida é a *Escherichia coli* uropatogênica e sua presença pode chegar a 80% dos casos (SANDHOLM et al., 1975; DHALIWAL; WRAY; NOAKES, 1998; KREKELER et al., 2012).

Acredita-se que a *E. coli* fixe ao endométrio estimulado pela progesterona (VAN CRUCHTEN et al., 2003) e seus fatores de virulência uropatogênicos, como os genes associados a infecções urinárias (*pap*), ligada a determinação de enteropatogenicidade (*sfa*), produção de hemolisinas (*hly*) e fator necrosante citotóxico (*cnf*). Em humanos estes genes aumentam a patogenicidade da *E. coli*, facilitando a ligação ao epitélio endometrial. Chen et al. (2003) e Arora et al. (2006) associaram o número de genes da *E. coli* uropatogênica ao aumento da severidade da piometra canina como resultado de maiores ligações no epitélio uterino.

Krekeler et al. (2012) pesquisaram a ligação de adesinas fimbriais Tipo1 (FimH) e verificaram que estas facilitam a aderência da *E. coli* no endométrio canino. A FimH medeia a ligação manose-sensível de *E. coli* a eritrócitos, leucócitos e células uroepiteliais com intuito de permitir a persistência do agente microbiano, reduzindo assim a eliminação de secreções mucosas promovendo a aquisição de nutrientes. Demonstraram que o receptor que aumenta o potencial de patogenicidade da *E. coli* uropatogênica facilita sua fixação ao endométrio.

Dhaliwal, Wray e Noakes (1998) demonstraram que na presença do *cnf* houve maior infiltração de células inflamatórias com redução da integridade do epitélio endometrial.

As bactérias mais isoladas do útero em caso de piometra incluem *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e

Proteus spp. que correspondem aos micro-organismos mais comumente isolados da vagina de cadelas normais (ETTINGER; FELDMAN, 2004)

Coggan et al. (2008) ao avaliarem 200 amostras de conteúdo intrauterino de cadela com piometra obteve o crescimento de micro-organismo em 98,5%. Destes 74,1% foram positivos para a *E. coli* e as demais amostras foram positivas para: *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Citrobacter diversus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae subsp. azanae*, *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus caprae*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus* sp., *Corynebacterium jeikeium*, *Staphylococcus kloosii* e *Enterococcus faecium*.

Bactérias como: *Proteus* spp., *Micrococcus* spp. (SANDHOLM et al., 1975; CARNEIRO; TONIOLO; SCHOCKEN-ITURRINO, 2005; WEISSER et al., 2004), *Enterobacter* spp., *Pasteurella aerogenes* (WEISS et al., 2004), *Lactobacillus bacteroides* e *Sarcina* (CARNEIRO; TONIOLO; SCHOCKEN-ITURRINO, 2005) também já foram isoladas.

No entanto, Teunissen (1952) apud Watts, Wright e Whithear (1996) verificaram que alguns úteros com piometra não apresentaram isolamento bacteriano, o que indica que as bactérias podem estar ou não envolvidas no processo infeccioso ou que houve falha no momento da cultura.

2.3. Piometra e Complexo de Hiperplasia Endometrial Cística

A piometra é uma infecção aguda ou crônica definida como o acúmulo de conteúdo purulento no lúmen uterino e tipicamente ocorre durante ou após o período de dominância progesterônica, por isso é conhecida como uma doença do diestro, apesar de ocorrer em outras fases do ciclo estral ou na gestação (DOW 1959; SMITH, 2006; PRETZER, 2008).

A doença é caracterizada por uma infecção do útero e inflamação em associação com a doença sistêmica, acredita-se que envolvam componentes hormonais e bacterianos (DOW, 1959; DE BOSSCHERE et al., 2000; SMITH, 2006; PRETZER, 2008).

Piometra é a desordem endometrial mais frequente e importante que envolve o sistema reprodutor feminino da cadela. Sua incidência é alta, sendo uma das causas mais comuns de enfermidade e morte (BIGLIARDI et al., 2004; COGGAN, 2008), por comprometer diversos órgãos podendo evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (HAGMAN et al., 2011). Seu período de convalescência varia entre um e 180 dias (GIBSON et al., 2013). Enquanto que sua taxa de letalidade está entre 3% a 4% (SHARIF et al., 2013).

A idade avançada parece ser um fator predisponente, apesar de estudos relatarem cadelas com piometra entre 9 meses e 18 anos. Sua ocorrência é maior em fêmeas não castradas, nulíparas com idade média de 6,4-9,5 anos (DOW, 1959; EGENVALL et al., 2001; FUKUDA, 2001; HAGMAN et al., 2011). Egenvall et al. (2001) ao avaliarem o banco de dados da empresa de seguro da Suécia relatou uma incidência de 25% de piometra em cadelas antes dos dez anos.

Acredita-se que repetidos estímulos hormonais no útero por progesterona ou estrógeno predisponham a doença (DOW, 1959; SMITH, 2006; PRETZER, 2008). Em cadelas jovens a piometra esta associada a terapias hormonais realizadas com estrógeno e progesterona, para suprimir o estro, induzir o parto e provocar aborto e também associada a anormalidades anatômicas da vagina e vestibulo (PRETZER, 2008; HAGMAN et al., 2011).

Whitehead (2008) ao avaliar a incidência de piometra em cadelas de ocorrência natural com as que foram tratadas por estrógeno, concluíram que as aplicações de estrógeno aumentam o risco de piometra em 8,7 % nos primeiros quatro meses após a aplicação.

Cadelas que nunca pariram apresentam predisposição ao desenvolvimento da piometra, excluindo a raça Golden Retriever. Contudo, cadelas múltiparas, podem apresentar a doença uma vez que a gestação não dá proteção ao longo da vida. Embora tenha sido demonstrada na literatura uma associação protetora da prenhez nas raças Collie, Rottweiler e Labrador Retriever (HAGMAN et al., 2011).

Algumas raças como a Golden Retriever, Schnauzer Miniatura, Irish Terrier, São Bernardo, Border Collie, Cocker Spaniel, Rottweiler e Bernese da Montanha são predispostas ao desenvolvimento da piometra (DOW, 1959; SMITH, 2006; PRETZER, 2008). Cadelas da raça Beagle, acima de 4 anos de idade, apresentaram uma incidência de 15,2% (FUKUDA, 2001; VERSTEGEN; DHALIWAL; VERSTEGEN-ONCLIN, 2008) enquanto que a Border Collie e Yorkshire Terrier

desenvolveram a doença com idade acima da média da população (GIBSON et al., 2013).

Segundo Hagman et al. (2011) o intervalo interestros curtos, precocidade sexual, ciclos estrais irregulares e repetidos ciclos ao longo da vida não aumentam o risco da enfermidade. Os autores sugerem que mecanismos fisiológicos tais como: a quantidade de secreção uterina, contrações do miométrio e a resposta imune uterina no diestro interferem na susceptibilidade de algumas raças.

Hagman et al. (2011) ao avaliar 245 cadelas saudáveis observaram que em 68 casos a pseudociese esteve ligada à redução do fator de risco ao desenvolvimento da piometra, acreditando assim, que a pseudociese não é fator predisponente para a enfermidade. De acordo com Martins (2007) a presença de tumores mamários não é fator de risco para a piometra, apesar do envolvimento dos hormônios reprodutivos na patogenia de ambas as doenças. Já o tumor ovariano, da célula da granulosa, pode estar associado à piometra, por produzir estrógeno e progesterona em concentrações semelhantes à fase de proestro em cadelas.

2.3.1. Etiopatogenia

Apesar de várias décadas de estudos, a etiopatogenia da piometra não está completamente determinada (DE BESSCHORE et al., 2000; BIGLIARDI et al., 2004).

De acordo com Dow (1959) a patogenia da piometra canina envolve o endométrio, estimulado por estrógeno seguido por intervalos prolongados de exposição à progesterona, contaminado por bactérias. O estrógeno participa na patogenia da piometra por manter o relaxamento cervical por mais tempo na fase lútea e por intensificar os efeitos estimuladores da progesterona no útero (ALLEN, 1995; ETTINGER; FELDMAN, 2004; HAGMAN et al., 2011).

A progesterona é responsável por manter o crescimento endometrial, a secreção glandular, o fechamento cervical, inibir os leucócitos, além de diminuir a contratilidade do miométrio o que pode resultar no acúmulo de secreção. Essa secreção constitui um excelente meio de cultura para o crescimento bacteriano (SUGIURA et al., 2004).

A hiperplasia endometrial cística (HEC) é uma resposta exacerbada do endométrio aos hormônios ovarianos com acúmulo de fluidos nas glândulas ou na cavidade uterina (FELDMAN; NELSON, 2004).

A hiperplasia endometrial induzida por progesterona geralmente precede o desenvolvimento da piometra. A combinação da redução da imunidade local favorece a colonização bacteriana nesta fase. Estes efeitos são cumulativos e cada ciclo estral agrava esta patologia (SUGIURA et al., 2004).

Tsumagari et al. (2005) ao induzirem a piometra com inoculações de *E. coli* intrauterina observaram que no início do diestro (11-20 e 21-30 dias) o útero estava mais susceptível a infecções por ser o período de maior secreção da progesterona. A diminuição da capacidade de fagocitose dos leucócitos e a porcentagem de células que estimulam a explosão oxidativa, desencadeado pela *E. coli*, durante a fase lútea tardia, juntamente com a diminuição da resposta imune inata pode contribuir para a maior incidência de piometra neste período (HOLST et al., 2013).

O útero já comprometido é invadido por patógenos oportunistas principalmente a *E. coli*, originada da flora vaginal, intestinal ou do trato urinário do mesmo animal, (SCHULTHEISS et al., 1999; SIQUEIRA, 2006) que durante o estro, podem ascender para o útero. Normalmente os mecanismos de defesa eliminariam estas bactérias, contudo, quando as concentrações de progesterona estão elevadas acaba reduzindo a resposta inflamatória. Além disso, cadelas com HEC apresentam dificuldade em eliminar as bactérias que parecem sobreviver no fluido cístico (ALLEN, 1995; DE BOSSCHERE et al., 2001)

A HEC e a piometra podem, eventualmente, desenvolver de forma independente e poderiam ser divididas em duas entidades separadas, devido às suas diferenças clínicas e histopatológicas (DE BOSSECHERE et al., 2000).

De Bosschere et al. (2002) ao avaliarem receptores de estrógeno e de progesterona concluíram que durante a HEC estes apresentavam-se mais elevados em cadelas com piometra, o que reforça as diferenças entre as patologias.

O endométrio de cadelas com hiperplasia endometrial cística permanece receptivo a baixa dose de estrógeno e isto pode esclarecer a continua proliferação das glândulas endometriais durante a fase lútea. A ação simultânea de estrógeno e progesterona poderia explicar as modificações nas proliferações císticas que são características da piometra (DE BOSSCHERE et al., 2002; VOLPATO et al., 2012).

De Bosschere, Ducatelle e Tshamala (2003) observaram através da indução da piometra em cadelas normais, que a HEC não é um pré-requisito para o desenvolvimento da piometra, pois induziram a infecção uterina durante o diestro normal inoculando *E. coli* no útero.

Sugiura et al. (2004) e Tsumagari et al. (2005) sugeriram que a sequência clássica de progesterona levando a HEC e, subsequentemente, piometra pode não ser correto. Ou seja, a sequência pode estar invertida e, na verdade, as bactérias seriam o fator de iniciação.

Uma infecção subclínica do endométrio ou irritação por corpos estranhos poderia ocorrer primeiramente no final do estro ou nos primeiros dias do diestro, proporcionando o incentivo para uma excessiva hipertrofia e hiperplasia endometrial, semelhante ao que se observa durante a implantação. A proliferação glandular do endométrio, com secreções epiteliais no lúmen, poderia iniciar o desenvolvimento da piometra ou mucometra, dependendo se o promotor fosse de origem bacteriana ou não, respectivamente. Esta hipótese se sustenta nas observações que na fase de diestro, uma variedade de substâncias biológicas, físicas e químicas estimulam a proliferação endometrial, além disso, cadelas jovens que tiveram piometra não apresentaram HEC (SUGIURA et al., 2004; TSUMAGARI et al., 2005).

Apesar da estimulação hormonal da progesterona ser o passo inicial para o desenvolvimento da HEC e piometra as concentrações séricas de progesterona não diferem entre animais em diestro e com as desordens (DOW, 1959; SMITH, 2006; PRETZER, 2008).

2.3.2 Sinais Clínicos

A piometra é um distúrbio grave, potencialmente letal, devido à sepse e choque séptico que podem se desenvolver rapidamente (PRETZER, 2008).

Os sinais clínicos são evidenciados na fase do diestro ou início do anestro. O histórico tipicamente relata que a fêmea esteve no cio entre 1 a 4 meses antes ou que recentemente foi tratada com progesterona. Uma série de sinais clínicos pode ser percebida pelo proprietário, sendo o mais comum o corrimento vaginal, que pode variar de piohemorrágico a mucopurulento (SMITH, 2006).

A apresentação clínica da piometra irá depender da abertura cervical, cadelas que apresentam a cérvix aberta apresentam fluidos de coloração purulenta ou piohemorrágica podendo ou não apresentar sinais de envolvimento sistêmico como: letargia, inapetência, anorexia, poliúria, polidipsia, vômito ou diarreia (PRETZER, 2008).

As cadelas que apresentam a cérvix fechada têm maior envolvimento sistêmico como: letargia, prostração, distensão abdominal e perda de peso. Geralmente são apresentadas mais tardiamente ao médico veterinário, com a doença em estágio avançado, requerendo uma intervenção imediata para diminuir o risco de morte da cadela (ETTINGER; FELDMAN, 2004; SMITH, 2006; PRETZER, 2008).

Segundo Egenvall et al. (2001) ao analisarem o banco de dados de seguros da Suécia os sinais clínicos mais relatados foram corrimento vaginal (84%), letargia (83%), inapetência (72%), polidipsia (64%) e desidratação (43%).

Ao exame clínico as cadelas podem estar com hipotermia, normotermia e com febre. A febre esta associada à inflamação uterina e, secundariamente, à contaminação bacteriana ou endotoxemia. Cadelas com febre devido à sepse apresentam-se com taquicardia, tempo de preenchimento capilar prolongado, pulso das artérias femorais fraco e temperatura retal anormal. O aumento uterino pode ser percebido através da palpação abdominal, contudo palpações mais profundas são desaconselhadas pelo risco de ruptura uterina e peritonite (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

A poliúria e polidipsia compensatória podem ocorrer devido à redução na habilidade dos túbulos renais em concentrar urina, resultado da deposição de endotoxinas da *E. coli* nestes túbulos. As mucosas podem estar pálidas e anêmicas devido à supressão da eritropoiese decorrente da sepse e toxemia. O acúmulo de fluídos no lúmen uterino provoca uma severa distensão do útero (HÄHN, 2003; SMITH, 2006; PRETZER, 2008).

As manifestações clínicas de doenças uterinas são diversificadas e inespecíficas, normalmente, o aparecimento dos sinais clínicos é gradual e insidioso por isso qualquer cadela não castrada que apresente os sinais supracitados após o cio deve ser investigada para a doença (FOSSUM, 2005).

2.3.3. Alterações Laboratoriais

Piometra está associada à alteração de vários parâmetros bioquímicos e hematológicos. Classicamente é acompanhada por leucocitose caracterizada por neutrofilia, com desvio a esquerda e degeneração tóxica de neutrófilos, e monocitose. A leucocitose é mais marcante em cadelas com piometra de cérvix fechada. Estudos hematológicos revelam que o leucograma pode estar normal ou diminuído, acredita-se que a leucopenia por linfopenia e neutropenia sejam decorrentes da ação de endotoxinas bacterianas produzidas por bactérias gram-negativas (BARTOSKOVA et al. 2007; PRETZER, 2008).

Cães com leucopenia apresentam maior mortalidade em comparação com os que apresentam contagens de leucócitos normais ou elevados (AROCH; KLEMENT; SEGEV, 2005). A piometra está associada a uma resposta inflamatória, mas também com uma supressão acentuada das atividades do sistema imunológico (FALDYNA, LAZNICKA; TOMAN, 2001).

Faldyna, Laznicka e Toman (2001) avaliaram a função imune em 34 cadelas com piometra, na qual 35% apresentaram linfopenia e eram as mais debilitadas. Especulou-se que a linfopenia fosse decorrente da inibição provocada pela lactoferrina. Contudo, Bartoskova et al. (2009) avaliaram a concentração de lactoferrina em cadelas com piometra mas não encontraram correlação com a imunossupressão dos linfócitos uma vez que estes permaneceram baixos após a ovariossalpingohisterectomia.

O eritrograma de cadelas com piometra é caracterizado por anemia normocítica e normocrômica arregenerativa decorrente da cronicidade, supressão tóxica da medula óssea e por perda de eritrócitos por diapedese para lúmen uterino. A acidose metabólica já foi relatada (EMANUELLI, 2007; PRETZER, 2008).

Em relação à função hepática a piometra causa lesão hepatocelular resultado da colestase intra-hepática e retenção dos pigmentos biliares, sem evidência de lesão lobular. As lesões hepatocelulares podem ser também secundárias a endotoxemia, a desidratação ou ao choque. O aumento das atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) pode ser causado pelos efeitos das endotoxinas da *E. coli* (BIGLIARDI et al., 2004).

Cadelas com piometra podem estar com hiperproteinemia e hiperglobulinemia secundária à desidratação e devido à estimulação antigênica

crônica do sistema imunológico (ETTINGER; FELDMAN, 2004; SMITH, 2006; PRETZER, 2008).

A disfunção renal pode estar presente nesta enfermidade. Observa-se ureia e creatinina elevadas em consequência da azotemia pré-renal resultante da desidratação. A filtração glomerular pode estar diminuída indicando que fatores associados com a doença afetam a perfusão renal. Quando a infecção bacteriana é causada pela *E. coli*, suas endotoxinas podem prejudicar a reabsorção de sódio e cloro pela alça de Henle, o que reduz a hipertonicidade medular comprometendo a capacidade dos túbulos renais em reabsorver a água, o que leva a poliúria e polidipsia compensatória. Uma insensibilidade ao hormônio anti-diurético pode contribuir para a perda da capacidade de concentração. A isostenúria ou hipostenúria são encontradas (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

A inflamação túbulo intersticial é observada em cães com piometra, mas o dano glomerular não é maior em cadelas com piometra comparado a população normal de cães. Infiltrado intersticial linfoplasmocitário, muitas vezes visto em local periglomerular, foram acompanhados por uma maior prevalência de fibrose intersticial e atrofia tubular em cães com piometra. Acredita-se que a piometra conduza a uma glomerulonefrite imunomediada. Contudo, a literatura atual é ambígua sobre esse ponto, uma vez que, depósitos imunes em glomérulos de indivíduos saudáveis são documentados em suínos, humanos e cães idosos sem qualquer doença renal preexistente (VERSTEGEN; DHALIWAL; VERSTEGEN-ONCLIN, 2008).

Cadelas com piometra podem estar inicialmente hiperglicêmicas. O cortisol apresenta efeitos anti-insulínicos ao inibir a captação de glicose, o metabolismo de tecido periférico e estimular o depósito de glicogênio hepático. Enquanto que as catecolaminas estimulam a glicogenólise hepática e o aumento do cálcio intracelular. Mas, a infecção gera um gasto energético alto esgotando os depósitos de glicogênio, aumentando a utilização de glicose periférica e reduzindo a gliconeogênese, o que faz as cadelas entrarem em quadros hipoglicêmicos (DICKSON, 1996; ETTINGER; FELDMAN, 2004).

2.3.4. Alterações Histopatológicas

De Bosschere et al. (2001) ao avaliarem 26 útero de cadelas clinicamente saudáveis não encontraram evidências de processo inflamatório. Dessas cadelas (17/26) 65,38% apresentaram alterações de HEC de forma leve a severa.

A hiperplasia endometrial, ao microscópico, caracteriza-se por apresentar grande número de glândulas endometriais que podem estar dilatadas ou císticas, com edema do estroma podendo ter a presença de muco (NASCIMENTO; SANTOS, 2007).

De Bosschere et al. (2001) relataram que cadelas com piometra apresentam alterações histológicas de variados graus de infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos) no endométrio e nos, casos mais graves, no miométrio. A hiperplasia endometrial cística pode estar presente. Há relatos de proliferação de fibroblastos no estroma endometrial, com edema, necrose, ulcerações, hemorragia, formação de abscesso glandular. Ocasionalmente há grave inflamação no endométrio e miométrio com atrofia endometrial bem como metaplasia escamosa do epitélio endometrial.

Dow (1959) propõe a classificação do complexo de hiperplasia endometrial cístico – piometra: tipo I- quando há HEC sem reação inflamatória; tipo II- HEC esta associada com a infiltração de mononucleares (linfócitos e plasmócito); tipo III- quando há exsudato purulento e infiltrado de neutrófilos; tipo IV- quando há, predominantemente, exsudação purulenta e hipotrofia do endométrio.

Weisser (2004) usando a metodologia adaptada de Dow (1959) relata que apesar das variações nos graus de hiperplasia endometrial cística, a presença de dilatações císticas das glândulas endometriais com infiltrado inflamatório, com focos hemorrágicos, formados por neutrófilos linfócitos e plasmócitos estavam presentes em 50% das amostras.

2.3.5. Diagnóstico por imagem

O diagnóstico de cadelas com piometra é normalmente realizado com o auxílio da ultrassonografia e exame radiográfico (SMITH, 2006; PRETZER, 2008). A ultrassonografia é um exame útil e de fácil realização para detectar alterações no

útero e de acompanhamento do tratamento clínico (HÄHN, 2003; BIGLIARDI et al., 2004). Na ultrassonografia o útero está largo, com os cornos tubulares e sua ecogenicidade irá depender da celularidade do exsudato e pode variar de anecóico a hipoecóico. O endométrio pode apresentar estruturas císticas associadas à piometra (HÄHN, 2003; PRETZER, 2008).

Bigliardi et al. (2004) ao avaliarem a ultrassonografia para o diagnóstico do complexo de hiperplasia endometrial mostraram sua eficiência em avaliar a classificação III e IV de Dow (1959) e no grupo de mucometra, endometrite, piometra hiperplásica e atrófica segundo De Bosschere (2001).

Outro diagnóstico por imagem que pode ser usado, apesar de ser pouco conclusivo, é o exame radiográfico. Nele o órgão pode ser identificado de forma tubular com conteúdo líquido denso, localizado entre o colón descendente e bexiga e de tamanho maior que as alças intestinais. O exame pode ainda avaliar a ruptura uterina, peritonite e a presença de fetos, no entanto, a incapacidade de visualizar o útero não exclui o diagnóstico de piometra (SMITH, 2006; PRETZER, 2008).

2.3.6. Biopsias Endometriais

Casos de endometrite sem fluido são de difícil diagnóstico ao ultrassom e a habilidade de detectar HEC no endométrio irá depender do tamanho do cisto e presença de líquido (HÄHN, 2003; CHRISTENSE et al., 2012). Segundo Christensen et al. (2012) a ultrassonografia tem se mostrado uma ferramenta útil para a detecção da HEC, piometra e gestação mas não apresenta bons resultados para o diagnóstico de doenças inflamatórias como a endometrite. Como alternativa surgiu à biopsia endometrial transcervical.

A biopsia transcervical é normalmente utilizada para o diagnóstico das alterações endometriais em várias espécies, mas pouco utilizada em cadelas por resultar em cicatrizes endometriais e infecções (GROPETTI et al., 2010). Christensen et al. (2012) ao avaliarem esta técnica em cadelas, observaram que ela pode ser utilizada para o diagnóstico de inflamação, hiperplasia endometrial e fibrose. Mas que era contraindicada durante o diestro devido às propriedades irritativas do endométrio nessa fase.

2.3.7. Citologia Endometrial

Outra técnica que auxilia no diagnóstico de doenças uterinas é a citologia endometrial já rotineira em bovinos, equinos e humanos. Atualmente, a colheita deste material pode ser realizada por meio de swab de algodão estéril (STUDER; MORROW, 1978), lavado uterino de baixo volume por canulação transcervical (WATTS; WRIGHT; LEE, 1998) e pela técnica de escova endometrial (*cytobrush*) (KASIMANICKAM et al., 2005).

Para Groppetti et al. (2010) o método de escova endometrial pode distorcer as células e é contra indicada na fase diestro, contudo esta técnica é indicada na análise computadorizada da morfometria nuclear por preservar a morfologia dos núcleos.

Cocchia et al. (2012) relataram, em éguas, que a técnica de *cytobrush* e a técnica de esfregaço por swab de algodão se mostraram superiores ao lavado uterino de baixo volume devido à facilidade, viabilidade e tempo de obtenção das amostras. Além disso, a técnica de *cytobrush* apresentou na leitura das lâminas uma maior celularidade e com baixo grau de distorção celular quando comparado à infusão de fluido uterino. E apenas pelo método de *cytobrush* houve a presença de linfócitos e eosinófilos, justificou-se pelo fato de suas cerdas mais rígidas rasparem a superfície endometrial e penetrarem na glândula, colhendo células inflamatórias infiltradas no endométrio (MARTIN-HIRSCH et al., 2007).

Em bovinos, a técnica de *cytobrush* de acordo com BARAŃSKI et al. (2012) foi considerada mais viável do que a lavagem uterina por ser de fácil execução e por permitir maior repetibilidade aumentando o monitoramento da saúde uterina de vacas com endometrite subclínica. As raspagens da superfície do endométrio são avaliadas microscopicamente para determinar a proporção do número de polimorfonucleares (PMN) e células epiteliais. A proporção de PMN considerada fisiológica em bovinos é feita em relação aos dias pós-parto e está entre 4% a 18% no período de quatro a seis semanas pós-parto.

A aplicação clínica da citologia do trato reprodutivo é um campo relativamente novo de pesquisa na cadela, mas que pode fornecer uma ajuda valiosa no diagnóstico de doenças uterinas, como o adenocarcinoma, endometrite e hiperplasia endometrial (GROPETTI et al., 2010; BASTAN et al., 2012).

A primeira descrição citológica do endométrio canino foi realizada por Watts, Wright e Lee (1998). O estudo envolveu amostras de 48 úteros de cadelas em durante as fases do ciclo estral e 10 úteros no *post-mortem*. A colheita do material ocorreu pelo lavado uterino de baixo volume por canulação transcervical com auxílio de endoscópio. Esse método, contudo, dificultou a diferenciação dos linfócitos e macrófagos das células endometriais isoladas por causa de sua degeneração. Os autores relataram ainda dificuldade em quantificar as amostras da citologia endometrial, uma vez que vários métodos de contagem têm sido utilizados o que pode interferir no número destas células. Outros fatores como a quantidade de volume recuperado a partir da lavagem uterina, a concentração de células no líquido recuperado, a quantidade de fluido centrifugado e a distribuição das células nas lâminas também a influenciavam.

Watts, Wright e Lee (1998) descreveram a variação das células epiteliais do endométrio durante todo o ciclo estral e observaram que as células do endométrio tinham sinais de degeneração no período de diestro e anestro puerperal. E que a citologia endometrial de cadelas, para a contagem de 100 leucócitos, apresentou o número de neutrófilos nas fases de proestro de $88 \pm 6 \%$, estro $94 \pm 7 \%$, diestro $90 \pm 13 \%$ e anestro puerperal $45 \pm 25 \%$. Enquanto que os linfócitos e macrófagos estavam em maior proporção durante o anestro de $80 \pm 1 \%$ e $23 \pm 25 \%$, respectivamente.

Groppetti et al. (2010) ao avaliar a citologia endometrial, de 35 cadelas saudáveis, por lavado uterino de baixo volume através da canulação transcervical, durante as fases do ciclo estral, e em 10 cadelas que possuíam condições patológicas, juntamente com a análise histológica, descreveram que a citologia entrou em concordância com o diagnóstico clínico e histológico relativos à normalidade e aos processos inflamatórios e degenerativos do útero. E que a metodologia utilizada foi relativamente fácil, rápida e pouco invasiva e que é viável em um ambiente clínico.

Segundo Groppetti et al. (2010) as células epiteliais do endométrio mostraram forte coesão e tendiam a formar ninhos celulares. Estimando a média das células de defesa/20 campos observaram a presença de neutrófilos em maior número no proestro e estro, contudo foram os únicos leucócitos detectados no início do diestro. Os neutrófilos em cadelas saudáveis corresponderam à fase de proestro ($4,3 \pm 0,7$), estro ($2 \pm 0,6$), diestro ($1,5 \pm 0,9$) e anestro ($0,2 \pm 0,9$) em cadelas. Enquanto que

animais com piometra os neutrófilos foram equivalentes à $(50,2 \pm 5,2)$, linfócitos $(1,3 \pm 0,2)$ e macrófagos $(2,1 \pm 0,2)$.

Groppetti et al. (2010) observaram a presença de bactérias no útero durante a fase folicular e no anestro, concordando com o estudo de Watts, Wright e Lee (1998). Além disso, relataram a presença de células plasmáticas, linfócitos e eosinófilos que até então não haviam sido descritos em cadelas.

O uso da citologia endometrial em cadelas pode ser uma ferramenta diagnóstica para o acompanhamento e evolução das desordens reprodutivas, pois ela reflete as alterações estruturais do endométrio em seu estado fisiológico e patológico. No momento em que houver avanços nas técnicas de obtenção das amostras, esta será uma realidade no auxílio do diagnóstico das desordens uterinas (WATTS; WRIGHT; LEE, 1998; GROPPETTI et al., 2010; BASTAN et al., 2012).

2.3.8. Tratamento e prognóstico

O tratamento de escolha na maioria dos casos de piometra é ovariosalpingohisterectomia, o que é bem sucedida em 83 a 100% dos casos. Este procedimento combinado com antibioticoterapia melhora as alterações hematológicas e imunológicas por volta de sete dias após a cirurgia. Embora o tratamento não deva ser retardado, os pacientes devem ser estabilizados antes da cirurgia, através da administração de fluidos intravenosos e antibióticos de amplo espectro (BARTASKOVA et al., 2007; VERSTEGEN; DHALIWAL; VERSTEGEN-ONCLIN, 2008).

Nas cadelas com agregado valor reprodutivo, estas podem ser submetidas ao tratamento conservador. Uma variedade de fármacos luteolíticos e uterotônicos pode ser utilizada (FOSSUM, 2005). A administração de prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) promove a luteólise com consequente redução das concentrações de progesterona plasmática, o que induz ao relaxamento do colo uterino, contratibilidade miometrial e promove a drenagem das secreções uterinas. A cabergolina, agonista dopaminérgico, diminui atividade lútea por supressão da prolactina. O aglepristone bloqueia as atividades da progesterona por se ligar aos seus receptores (ETTINGER; FELDMAN, 2004; FOSSUM, 2005; SLATTER, 2007; VERSTEGEN; DHALIWAL; VERSTEGEN-ONCLIN, 2008).

A terapia antimicrobiana de amplo espectro deve ser administrada durante todo o protocolo e sua escolha será conforme a cultura, identificação e sensibilidade das bactérias envolvidas. O tratamento dura cerca de 10 a 14 dias após a resolução completa da piometra, avaliada por ultrassonografia, exame físico e exames de sangue. Para evitar a recorrência da infecção, a regeneração do útero é feita mediante o prolongamento do anestro, através do uso do Mibolerone. Ao se interromper o tratamento, o estro será observado a partir de algumas semanas ou meses (ETTINGER; FELDMAN, 2004; FOSSUM, 2005; SLATTER, 2007; VERSTEGEN; DHALIWAL; VERSTEGEN-ONCLIN, 2008).

Cadelas submetidas ao tratamento conservador devem ser reavaliadas entre dois e cinco dias do início do tratamento e, caso não respondam positivamente ao protocolo utilizado, a ovariectomia deve ser considerada. A incidência da recorrência de piometra após o tratamento médico ainda é controverso, há relatos de recorrência entre 10 e 77%. A taxa de concepção, em cadelas tratadas, varia de 50 a 75%, dependendo da idade do animal, mas a fertilidade em geral é maior nas mais jovens (ETTINGER; FELDMAN, 2004; SLATTER, 2007; VERSTEGEN; DHALIWAL; VERSTEGEN-ONCLIN, 2008).

Apesar de tratamentos modernos, a taxa de mortalidade para a piometra canina é de cerca de 4%. O óbito está relacionado à lesão miocárdica secundária à endotoxemia, inflamação, infecção bacteriana disseminada e ao infarto (AROCH; KLEMENT; SEGEV, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

O experimento foi delineado na seguinte ordem: a) caracterização da citologia endometrial de cadelas sadias de acordo com a fase do ciclo estral; b) influência do isolamento bacteriano uterino na citologia endometrial; c) influência da hiperplasia endometrial cística na citologia endometrial; d) caracterização do perfil citológico endometrial de cadelas com piometra.

3.2. Animais e Local de execução

Para esta pesquisa foram selecionadas 138 cadelas (*Canis familiaris*) de diferentes raças, provenientes do Projeto de Castração (n = 105) e do atendimento (n = 33) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) com o número de protocolo 046/13.

As fêmeas do Projeto de Castração eram saudáveis, de acordo com o exame clínico proposto (FEITOSA, 2008), e foram divididas em dois grupos: grupo 1 - 62 fêmeas com o ciclo estral não determinado; grupo 2 - 43 fêmeas com a fase do ciclo estral conhecido através do exame físico e citologia vaginal (OLSON et al., 1984) e classificadas de acordo com as fases do ciclo estral em: proestro (n = 21), estro (n = 4), diestro (n = 14) e anestro (n = 4). Das cadelas do grupo 2 (n = 43) foram colhidas amostras do conteúdo intra - uterino por meio de *swabs* dos cornos e submetidos ao cultivo bacteriano e a testes bioquímicos.

Do atendimento clínico-cirúrgico, foram incluídas 33 cadelas que apresentaram suspeita de piometra no exame clínico e aumento do diâmetro uterino na ultrassonografia (HÄHN, 2003; PRETZER, 2008). Os sinais clínicos considerados no exame foram inapetência, polidipsia, poliúria, letargia, distensão abdominal e secreção vaginal (DOW 1959; FELDMAN; NELSON, 2004; SMITH, 2006).

Para a caracterização da citologia endometrial foram colhidas amostras de 138 cornos uterinos por meio da raspagem do endométrio utilizando a escova

ginecológica *cytobrush*. Para a avaliação histopatológica foram colhidos fragmentos de cada corno uterino e conservados em formol a 10%.

3.3. Avaliação Macroscópica

Todos os animais foram submetidos à ovariosalpingohisterectomia (SLATTER, 2007) e os úteros colhidos, armazenados em sacos plásticos estéreis, refrigerados e encaminhados para o laboratório. No máximo de duas horas após a cirurgia, os úteros foram inspecionados macroscopicamente em relação à presença ou não de alterações inflamatórias (hiperemia, exsudato purulento e espessamento da parede). Foram inseridos no grupo piometra apenas os úteros que continham na aspiração secreção purulenta ou piohemorrágica.

3.3. Isolamento Bacteriano

A colheita do material para o isolamento bacteriano foi realizado nas amostras do grupo 2 (n = 43) da castração com o auxílio de swab estéril passado em toda extensão da mucosa uterina de cada corno.

O processamento microbiológico das amostras foi conduzido em paralelo com a cepa controle de *E. coli* (ATCC 25922) (Microbiologics®). As amostras colhidas foram transferidas para tubos de ensaio estéreis e analisadas conforme Coggan (2008). A identificação dos micro-organismos isolados foi realizada por testes bioquímicos usando o Kit Enterobactérias - 510918 (Laborclin®, Pinhais, Brasil).

Das amostras com crescimento bacteriano, mas sem a identificação de *E. coli*, as colônias foram submetidas a coloração de Gram - 620520 (Laborclin®) contendo soluções de corante Violeta Genciana, Fucsina, fixador Lugol e descorante à base de álcool-acetona, de acordo com as recomendações do fabricante.

3.4. Citologia Endometrial

A citologia endometrial foi realizada em todas as amostras uterinas ($n = 138$) por meio da raspagem do endométrio do corno uterino utilizando escova ginecológica (*cytobrush*) (KASIMANICKAM et al., 2005). Dois esfregaços em lâminas histológicas previamente higienizadas foram confeccionados e corados por Panótico Rápido (Renylab®, Barbacena, Brasil). Cada lâmina foi examinada em microscopia de luz com objetiva de 100. Foi realizada a contagem das populações celulares compostas por: células endometriais e leucócitos. As contagens foram realizadas até o total de 200 células/lâmina de forma aleatória e feita por dois avaliadores experientes.

3.5. Análise histopatológica

Fragmentos de 2 cm² foram colhidos através da secção transversal do terço médio de ambos os cornos uterinos e conservados em formol 10% e processadas segundo Tolosa et al. (2003). A interpretação dos achados histológicos foi realizada conforme a metodologia de Dow (1959) adaptada por Weiss (2004), de acordo com a Tabela 1.

Tabela1- Classificação das alterações histológicas de acordo com o comprometimento celular, aspecto e tipos de células inflamatórias

Classificação		Alteração	Aspecto	Células	Características
I	Infiltrado inflamatório	Sem caracterização de hiperplasia	Leve infiltrado inflamatório	Polimorfonucleares	Células inflamatórias na mucosa e muscular
II	Leve	Hiperplasia leve	Leve infiltrado inflamatório	Linfócitos, plasmócitos e neutrófilos	Infiltrado inflamatório na mucosa
III	Moderada	Dilatação cística das glândulas endometriais	Infiltrado inflamatório difuso e acentuado	Neutrófilos e macrófagos	Congestão e hemorragia difusa moderada
IV	Acentuada	Dilatação cística das glândulas endometriais	Eosinofílico amorfo	Neutrófilos, linfócitos e plasmócitos	Infiltrado inflamatório com focos hemorrágicos

Fonte: adaptada de Dow (1959) por Weiss (2004)

3.5. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada como o auxílio do programa estatístico Minitab 16 (Minitab Inc®, Pennsylvania, USA). Os dados da análise descritiva foram apresentados em média e erro padrão da média. Para avaliar as comparações entre grupos, inicialmente, realizou-se o Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados apresentavam ou não distribuição normal, sendo que todas as variáveis exibiram comportamento não paramétrico. As variáveis acima de três grupos foram comparadas através do teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) e as que tinham dois grupos pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Para comparar a diferença de proporção de animais com hiperplasia endometrial cística entre as fases do ciclo estral foi usado o teste de qui-quadrado ($p < 0,05$). Os conceitos utilizados bem como a interpretação dos dados foram feitas de acordo com Vieira (2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho mostra a importância do ciclo estral na interpretação da citologia endometrial em cadelas, uma vez que houve diferença na fase de anestro. Além disso, demonstrou que há diferenças no perfil citológico de cadelas normais com e sem isolamento bacteriano e que a hiperplasia endometrial cística não interfere na citologia endometrial. Por fim, mostrou que a piometra influencia significativamente na citologia endometrial independente da classificação das alterações histológicas.

As células inflamatórias estiveram presentes em todas as fases do ciclo estral, sendo os neutrófilos as células mais representativas tanto na citologia de cadelas saudáveis como na piometra. Este resultado corrobora com os achados de Watts, Wrigth e Lee (1998) e Groppetti et al. (2010) que utilizaram para a colheita das amostras o lavado uterino de baixo volume através da canulação transcervical e Bastan et al. (2003) o swab uterino.

Na literatura consultada não foram encontradas pesquisas, em cadelas, que utilizaram a mesma metodologia de colheita, leitura e interpretação utilizada neste experimento. No entanto, não houve a intenção de comparar as técnicas de colheita.

Um fator importante na pesquisa foi que, pelo fato de as amostras serem colhidas de úteros após a cirurgia houve a possibilidade de padronizar o local, a força e o tempo. De acordo com Watts, Wrigth e Lee (1998), fatores como o volume e concentração de células recuperadas a partir da lavagem uterina, a quantidade de fluido centrifugado e a distribuição das células nas lâminas podem influenciar na quantificação.

4.1. O ciclo estral influencia na citologia endometrial

Ao comparar a citologia endometrial entre as fases do ciclo estral, houve diferença apenas em relação ao anestro que apresentou um menor número de neutrófilos $0,75 \pm 0,59\%$ e maior contagem das células do epitélio endometrial $99,25 \pm 0,59\%$. Quando se comparou a citologia endometrial de cada fase do ciclo estral com os animais do grupo sem a identificação do ciclo estral, também houve diferença no anestro para o número de neutrófilos e células do epitélio endometrial (Figura 1A; 1B). Os animais sem identificação do ciclo estral apresentaram maior número de neutrófilo e menor número de células do epitélio endometrial.

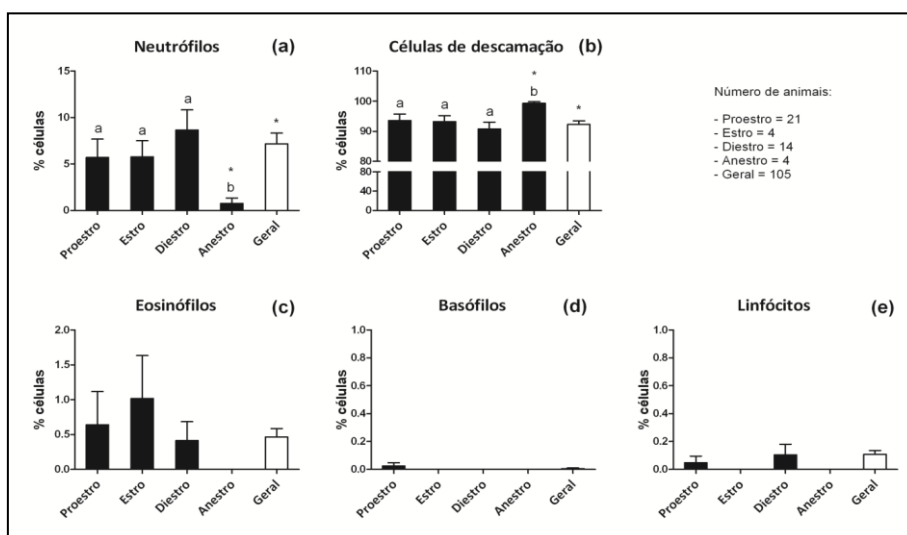


Figura 1. Caracterização da citologia endometrial de cadelas sadias classificadas de acordo com a fase do ciclo estral. Nota: Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$); letras a e b diferem entre as fases do ciclo estral; * difere entre as fases do ciclo estral e o grupo geral; avaliação do ciclo estral feita de acordo com Olson et al. (1984)

Os resultados concordaram com Watts, Wrigth e Lee (1998) que mostraram que os neutrófilos são as principais células de defesa encontradas nas fases de

proestro ($88 \pm 6\%$), estro ($77 \pm 100\%$) e diestro ($90 \pm 13\%$). Apenas diferiu em relação à fase de anestro onde estes autores verificaram que apenas $45 \pm 25\%$ dos leucócitos eram neutrófilos.

Apesar de não haver diferença significativa, as maiores proporções de neutrófilos foram identificadas no diestro (Figura 1A), semelhante ao encontrado por Watts, Wrigth e Lee (1998) e Chu, Lee e Wright (2006) ao analisar a histologia do epitélio luminal e glandular uterino de cadelas saudáveis.

As células endometriais foram observadas em todas as fases do ciclo. No entanto, as maiores médias foram vistas no anestro (Figura 1B), período em que ocorre a involução uterina (GROPETTI et al., 2010). Enquanto que os linfócitos, apesar de não haver diferença estatística, estavam em maiores proporções no proestro e diestro (Figura 1E). Watts, Wrigth e Lee (1998) e Groppetti et al. (2010) descreveram sua maior presença nos períodos de anestro e diestro.

4.2. O isolamento bacteriano uterino interfere na citologia endometrial em cadelas clinicamente saudáveis e sem alterações histológicas

Foram colhidas amostras de conteúdo intra-uterino de 43 cadelas com útero e secreção uterina normal e, destas amostras, realizado o exame de cultivo microbiológico. Houve crescimento bacteriano em 19/43 (44,18%) das secreções e observou-se a presença de bactérias de morfologias variadas, mas sem a identificação bioquímica da *E. coli*.

Houve maior número de isolamentos de cocos gram-positivos catalase - positivo seguido por bacilos gram-positivos e por cocos e bacilos gram-negativos. Os cocos gram-positivos catalase - positivos foram classificados no gênero *Staphylococcus* (LEVY, 2004).

Resultados semelhantes foram encontrados por Baba et al. (1983) que detectaram o crescimento microbiano em 48/78 (61,5%) amostras de útero de cadelas sadias. Desse total, os autores não identificaram patógenos na maioria das amostras positivas. Diferentemente, Maksimovic et al. (2012) e Olson e Mather (1978) detectaram a presença de agente microbiano em amostras de útero de cadelas sãs em apenas um animal de um total de cães equivalente a 40 (2,5%) e 22 (4,5%), respectivamente. A ausência de isolamento de *E. coli* nos úteros sadios

permite inferir que provavelmente esse agente está ligado com os casos de piometra canina.

Ao comparar os grupos de cadelas sadias sem ($n = 16$) e com ($n = 19$) isolamento bacteriano, houve diferença apenas na proporção de neutrófilos e células do epitélio endometrial para a fase de proestro (Figura 2A; 2B). Nas demais células avaliadas não houve nenhuma diferença entre as fases do ciclo estral.

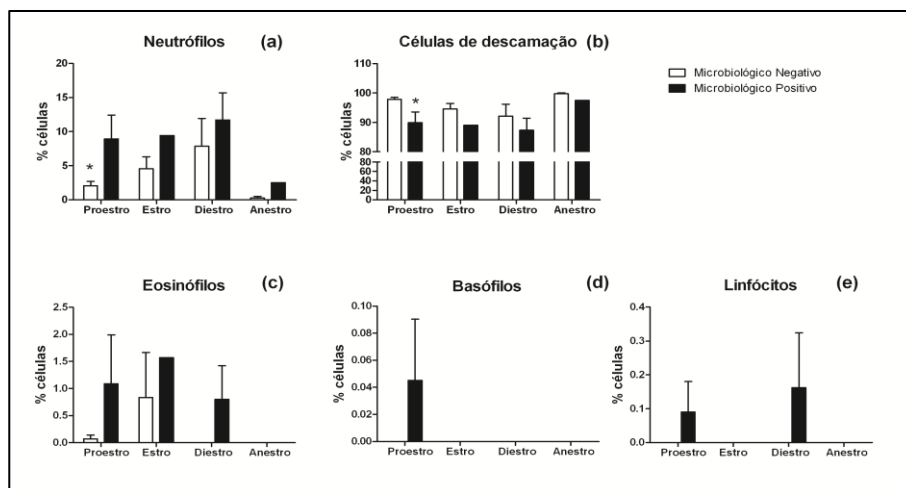


Figura 2. Comparação da citologia endometrial de cadelas sem isolamento bacteriano e histologia normal com cadelas em durante as fases ciclo estral. Nota: *diferença significativa nos neutrófilos e células do epitélio endometrial no proestro entre grupos, através do Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

A citologia endometrial nas cadelas com úteros saudáveis e sem isolamento bacteriano caracterizou-se no proestro (neutrófilos $2,05 \pm 0,64$ %, eosinófilos $0,07 \pm 0,07$ % e células do epitélio endometrial $97,87 \pm 0,63$ %), no estro (neutrófilos $4,55 \pm 1,76$ %, eosinófilos $0,83 \pm 0,83$ % e células do epitélio endometrial $94,62 \pm 1,83$ %), no diestro (neutrófilos $7,87 \pm 4,07$ % e células do epitélio endometrial $92,13 \pm 4,07$ %) e no anestro (neutrófilos $0,24 \pm 0,24$ % e células do epitélio endometrial $99,75 \pm 0,24$ %). Os autores deste estudo consideram que estes valores possam servir como referência fisiológica para a espécie canina nas diferentes fases do ciclo estral.

Nas cadelas com isolamento bacteriano, 57,9% (11/19) estavam no proestro, 31,6% (6/19) no diestro, 5,3% (1/19) no estro e 5,3% (1/19) no anestro. Watts, Wright e Whithear (1996) acreditam que microfloras transitórias semelhantes às encontradas na vagina e cérvix se estabelecem na fase de proestro e estro. Na fase de proestro existe o predomínio de estrógeno o que possibilita maior vascularização, maior fluxo sanguíneo e atividade metabólica (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Diante disso pode-se inferir que a presença de isolamento bacteriano influencia o número de neutrófilos e células de descamação durante a fase de proestro.

Eosinófilos foram observados nas fases de proestro e estro, como o observado por Groppetti et al. (2010), e apenas na fase diestro em cadelas com isolamento bacteriano. Critchley et al. (2001) acreditam que os eosinófilos sejam carreadores de estrógeno para o útero uma vez que foram relatadas na fase folicular. Goericke-Pesch et al. (2010) verificaram que na cérvix a presença dos eosinófilos era influenciada pelo ciclo estral e que faziam parte do sistema residente do útero de cadelas saudáveis e não prenhas.

4.3. A hiperplasia endometrial cística não interfere na citologia endometrial de cadelas

Do total de 41 cadelas, saudáveis no exame clínico e sem alterações macroscópicas na inspeção do útero, 14,6 % (6/41) apresentaram hiperplasia endometrial cística (HEC) (Tabela 2). Apesar de não haver diferença significativa da presença de HEC, o maior percentual foi observado no diestro (23%). Este resultado foi inferior ao de De Bosschere et al. (2000), que de 26 cadelas clinicamente saudáveis, 65,38% apresentaram alterações de HEC de forma leve a severa e, destas, 13 estavam na fase de diestro do ciclo estral.

Resultados semelhantes foram observados por Dow (1959) e Schlafer e Gifford (2008) que descrevem que o complexo HEC ocorre durante a fase lútea do ciclo reprodutivo. Schlafer e Gifford (2008) e De Bosschere et al. (2002) relacionaram que cadelas que apresentam HEC tem uma expressão continua de receptores estrogênicos, como consequência, o endométrio fica receptivo para baixos níveis de estrógeno circulantes o que pode ocasionar uma proliferação contínua de glândulas endometriais durante o diestro.

Tabela 2. Número de cadelas com hiperplasia endometrial cística durante as fases do ciclo estral na presença ou não de bactérias

Isolamento bacteriano	Fases do ciclo estral				χ^2
	Proestro	Estro	Diestro	Anestro	
Sem	12,5% (1/8)	0% (0/3)	33,3% (2/6)	0% (0/2)	-
Com	5,4 % (2/13)	0% (0/1)	14,3% (1/7)	0% (0/1)	-
Total	4,3% (3/21)	0% (0/4)	23% (3/13)	0% (0/3)	$p= 0,5842$

Nota: χ^2 : teste de qui-quadrado ($p < 0,05$)

Não houve diferença ($p = 1,0$) entre o número de animais sem (3/19) e com (3/22) isolamento bacteriano que apresentaram HEC, assim como para a citologia endometrial (figura 3). Cadelas com HEC apresentaram a proporção de neutrófilos correspondente a $2,82 \pm 1,12\%$, eosinófilos $0,33 \pm 0,11\%$ e células do epitélio endometrial $96,85 \pm 1,11\%$. Groppetti et al. (2010) descreveram que durante a HEC os linfócitos estavam ausentes e que os neutrófilos corresponderam a $0,6 \pm 0,3$.

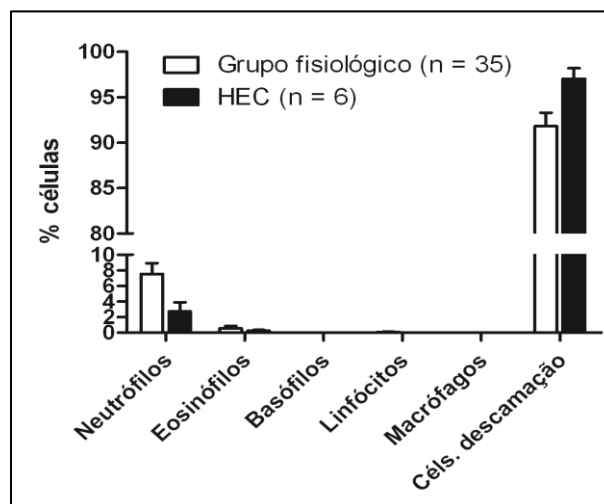


Figura 3 – Citologia endometrial de cadelas com e sem HEC. Nota: Não houve diferença entre os grupos, através do Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

4.4. A piometra interfere na citologia endometrial

Cadelas com piometra apresentaram maiores proporções de células inflamatórias, principalmente, na porcentagem de neutrófilos e linfócitos quando comparadas a cadelas com condições uterinas normais (Figura 4A; 5A; 5B). O que concorda com o descrito por Groppetti et al. (2010) e Bastan et al. (2003).

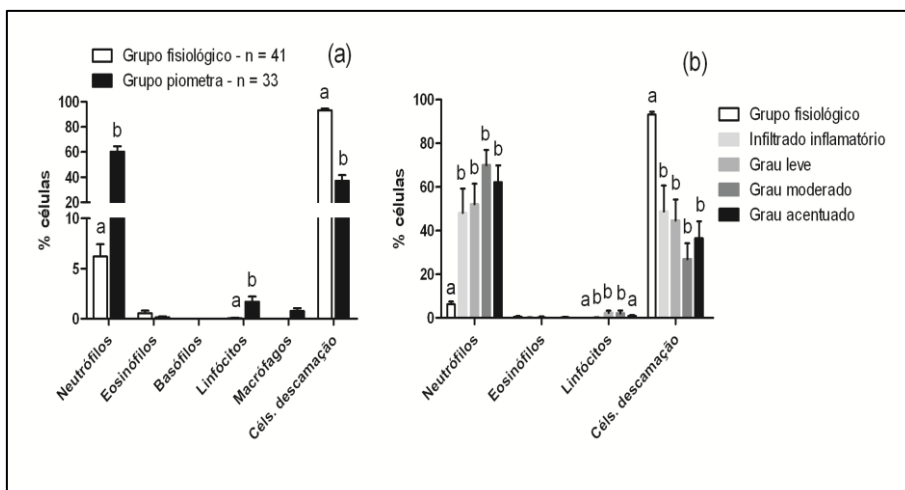
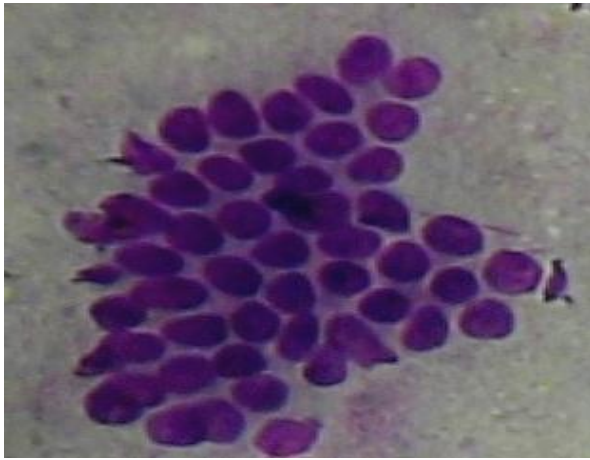


Figura 4 – Influência da piometra na citologia endometrial de cadelas (A) Classificação Histológica (B). Nota: (a) letras diferentes significam diferença entre grupos, através do teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$); (b) letras diferentes significam diferença significativa entre os níveis de alterações histológicas, através do teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Na classificação histopatológica nenhuma amostra correspondeu à classificação do infiltrado inflamatório o que colabora com Weiss (2004). As demais cadelas apresentaram a classificação leve ($n = 7$), moderada ($n = 12$) e acentuada ($n = 9$). Não houve diferença entre as proporções de células inflamatórias para a classificação das alterações histológicas adaptadas de Dow (1959) modificada por Weiss (2004) (Figura 4B; 6). Contudo as maiores médias de neutrófilos foram em cadelas classificadas como moderado ($70,04 \pm 6,93$).

Neste trabalho a proporção de neutrófilos nas cadelas com piometra correspondeu a $60,30 \pm 4,32\%$, enquanto que eosinófilos $0,14 \pm 0,09\%$, linfócitos $1,71 \pm 0,52\%$, macrófagos $0,76 \pm 0,3\%$ e células do epitélio endometrial $37,08 \pm 4,41\%$ (Figura 4A). Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Groppetti et al. (2010) nas cadelas com piometra, com maior predominância de neutrófilos. A piometra apresentou uma proporção de neutrófilos mais elevada quando comparada a HEC ($2,82 \pm 1,12\%$) e a fase do diestro de cadelas saudáveis sem inflamação uterina ($7,87 \pm 4,07\%$).

(A)



(B)

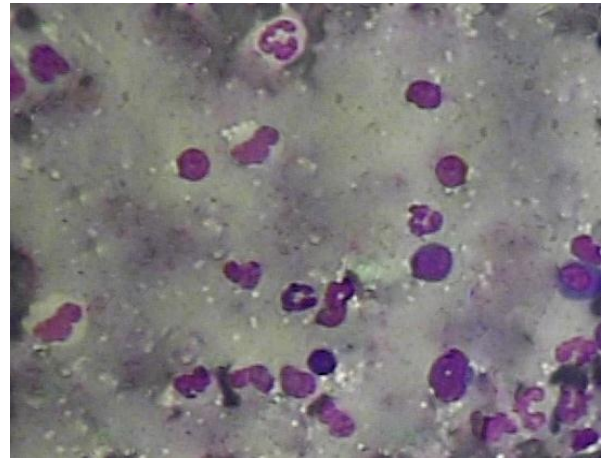
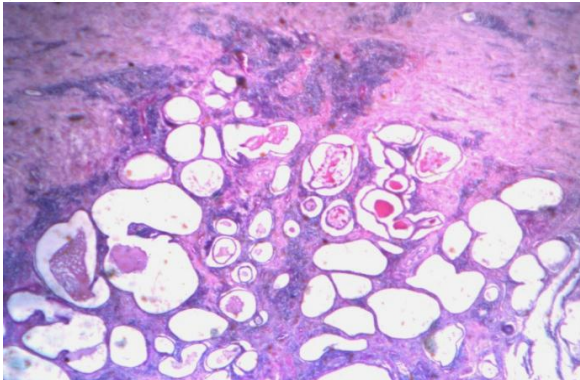
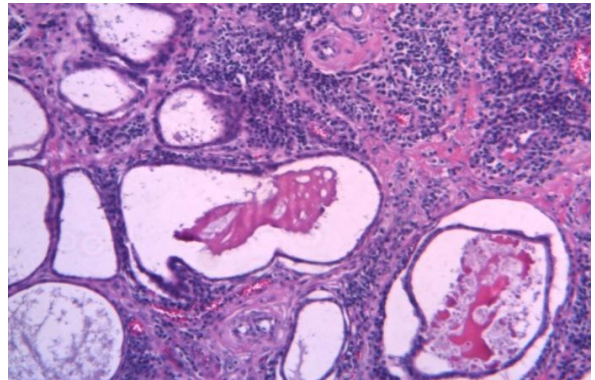


Figura 5: Citologia endometrial de cadelas: (A) Clinicamente saudáveis e sem enfermidades uterinas com presença de células do epitélio endometrial; (B) Piometra com a presença de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células do epitélio endometrial. Aumento de 40. Coloração Panótico Rápido

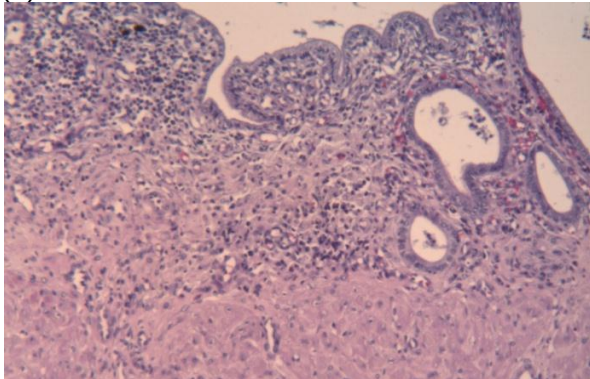
(A 1)



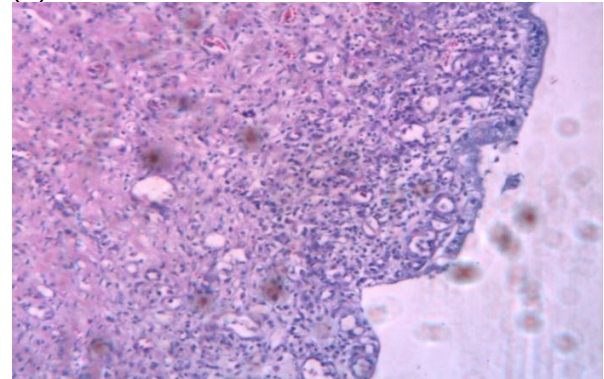
(A 2)



(B)



(C)



(D)

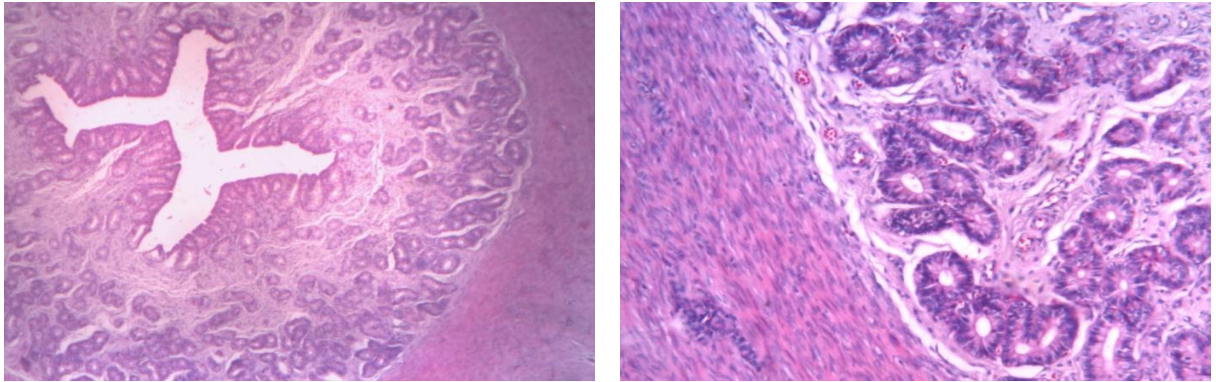


Figura 6- Classificação histopatológica do útero de cadelas com piometra de acordo com Dow (1959) adaptada por Weiss (2004) e com o útero normal; (A1) Classificação acentuada aumento 10; (A 2) aumento de 40; (B) Classificação moderada aumento de 10; (C) Classificação Leve aumento de 10; (D1) útero normal sem alterações histológicas aumento 10 (D2) aumento de 40. Coloração de Hematoxilina e Eosina.

5. CONCLUSÕES

A citologia endometrial é uma ferramenta útil no conhecimento das variações citológicas e que a fase do ciclo estral influencia a citologia endometrial. A hiperplasia endometrial cística e o isolamento bacteriano não interferem na citologia endometrial. A piometra influencia a citologia endometrial independente da classificação das alterações histológicas, sendo os neutrófilos as células mais presentes.

REFERÊNCIAS

ALLEN, W. E. **Fertilidade e obstetrícia no cão**. 2. ed. Livraria Varela, 1995. 197p.

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**, Stoneham, v. 66, n.4, p.1530-1536, 2006.

AROCH, I.; KLEMENT, E.; SEGEV, G. Clinical, biochemical, and hematological characteristics, disease prevalence, and prognosis of dogs presenting with neutrophil cytoplasmic toxicity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v.19, n. 1, p. 64-73, 2005.

BABA, E. H.; FURKATA, T.; ARAKAWA, A. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.44, n.4, p.606,1983.

BARTOSKOVA, A.; VITASEK, R.; LEVA, L.; FALDYANA, M. Hysterectomy leads to fast improvement of haematological and immunological parameters in bitches with pyometra. **Journal of Small Animal Practice**, Czech Republic, v. 48, p. 564-568, 2007.

BARTOSKOVA, A.; ADLEROVA, L.; KUDLACKOVA, H.; LEVA, L.; VITASEK, R.; FALDYNA, M. Lactoferrin in Canine Sera: A Pyometra Study. **Reproduction in Domestic Animals**, San Diego, v. 44, p. 193-195, 2009.

BARTOSKOVA, A.; TURANEK-KNOTIGOVA ; MATIASOVIC, J.; ORESKOVIC, Z. ; VICENOVÁ, M.; STEPANOVA, H.; ONDRACKOVA,P.; VITASEK, R.; LEVA, L.; MOORE, P.F.; FALDYNA, M. γ δ T Lymphocytes are recruited into the inflamed uterus of bitches suffering from pyometra. **The Veterinary Journal**, London, 194, p. 303- 308, 2012.

BARAŃSKI, W.; PODHALICZ-DZIEGIELEWSKA, M.; ZDUŃCZYK, S.; JANOWSKI, T. The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by

different cytologic thresholds. **Theriogenology**, Stoneham, v. 78, n. 9, p. 1939-1947, 2012.

BASTAN, A; CETIN, Y; GÜNGÖR, O; BASARAN, D.A. Köperklerde Seksüel Siklus Dönemleri, gebelikve pyometrada endometrial sitoloji bulgulari. **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Turk, v.27, p.893-897, 2003.

BIGLIARDI, E.; PARMIGIANI, E.; CAVIRANI, S.; LUPPI, A.; BONATI, L.; CORRADI, A. Ultrasonography and cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, San Diego, v.39, n.3, p.136-140, 2004.

CARNEIRO, A. P.; TONIOLO, G. H.; SCHOCKEN- ITURRINO, R. P.; Avaliação microbiológica da flora vaginal e corpo uterino de cadelas (*Canis familiaris*) submetidas a ovariossalpingohisterectomia. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, v.21, n.3, p. 361-367, 2004.

CHAPWANYA ,A; MEADE, K.; DOHERTY, M. L.; CALLANAN, J. J.; FARRELLY, C. O. Endometrial epithelial cells are potent producers of tracheal antimicrobial peptide and serum amyloid A3 gene expression in response to E. coli stimulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.151, p. 157-162, 2013

CHEN, Y. M. M.; WRIGHT, P. J.; LEE, C. S. BROWNING, G.F. Uropathogenic virulence factor in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.94, p.57-69, 2003.

CHOTIMANUKUL, S.; SIRIVAIIDYAPONG, S. Differential expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in healthy and infected canine endometrium. **Theriogenology**, Stoneham, v.76, n.6, p.1152-1161, 2011.

CHU, P. Y.; LEE, C. S.; WRIGHT, P. J. Degeneration and apoptosis of endometrial cells in the bitch. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, n. 6 - 7, p. 1545 – 1549, 2006.

CHRISTENSEN, B. W.; SCHLAFFER, D. H.; AGNEW, D. W.; WANG, C.; ASA, C.S. Diagnostic value of transcervical endometrial biopsies in domestic dogs compared to full thickness uterine sections. In: 7 international symposium on canine and feline reproduction. **Anais...** Canada, 2012.

COCCHIA, N.; PACIELLO, O.; AULETTA, L.; UCCELLO, V.; SILVESTRO, L.; MALLARDO, K.; PARAGGIO, G.; PASOLINI, M.P. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, Stoneham, vol. 77, p. 89-98, 2012.

COGGAN, J. A.; MELVILLE, P. A.; OLIVEIRA, C. M.; MORENO, A. M.; BENITES, N. R. Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, n.3, p.477-483, 2008.

CRITCHLEY, H. O.; KELLY, R. W.; BRENNER, R. M.; BAIRD, D. T. The endocrinology of menstruation- a role for the immune system. **Clinical Endocrinol**, Oxfor, v. 55, p. 701 – 710, 2001.

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

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; CORY, M. Estrogen-alpha and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch, **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 70, ed.3–4, p. 255–259, 2002.

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

DHALIWAL, G. K.; WRAY, C.; NOAKES, D. E. Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra). **Veterinary Record**, London, v. 143, n. 22, p. 659-661, 1998.

DICKSON, W. M. Glândulas endócrinas. In: Dukes. Fisiologia dos Animais Domésticos. 11^a ed. Guanabara Koogan. 1996. p. 571- 593

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal Of Comparative Pathology**, London, v. 69, p. 237 - 250, 1959.

EGENVALL, A.; HAGMAN, R.; BONNETT, B. N.; HEDHAMMAR, A.; OLSON, P.; LAGERSTEDT, A. S. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **Journal of Veterinary Intern Medicine**, v. 15, p. 530-538, 2001.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. "Urinary tract infections" **Textbook of Veterinary Internal Medicine**, 6^a Ed., 1800-1808, 2005.

EMANUELLI, M. P. **Hemograma, metabolismo oxidativo dos neutrófilos e peroxidação lipídica em cadelas com piometra por *Escherichia coli***. 2007. 38f. Dissertação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

FALDYNA, M.; LAZNICKA, A.; TOMAN M. Immunossupresion pyometra in the bitch. **Journal of small animal practice**, Oxford, v.42, p.2-10, 2001.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2008. 807p

FELDMAN, E. C; NELSON, R. W. **Canine and Feline. Endocrinology and reproduction**. 3ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004. cap. 33. p. 1016-1044.

FOSTER, R. A. Sistema reprodutivo da fêmea. In: McGavin M.D. **Bases da patologia em veterinária**. 4.ed. Elsevier . 2009. p. 1263-1283

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Roca. 2005. cap. 57, p. 919-928

FUKUDA, S. Incidence of pyometra in colony-raised beagle dogs. **Experimental animals**, Tokyo, v.50, n.4, p.325-329, 2001.

GIBSON, A.; DEAN, D.; YATES, D.; STAVISKY, J. A retrospective study of pyometra at five RSPCA hospitals in the UK: 1728 cases from 2006 to 2011. **Veterinary Record**, 2013.

GOERICKE-PESCH, S.; SCHMIDT, B.; FALHAR, K.; WEHREND, A. Changes in the histomorphology of the canine cervix through the oestrous cycle. **Theriogenology**, Stoneham, v.74, p.1075-1081, 2010.

GROPPETTI, D.; PECILE, A.; ARRIGHI, S.; DI GIANCAMILLO, A.; CREMONESI, F. Endometrial cytology and computerized morphometric analysis of epithelial nuclei: A useful tool for reproductive diagnosis in the bitch. **Theriogenology**, Stoneham, v. 73, n. 7, p. 927–941, 2010.

HÄHN, W. Ultrasonography in dogs and cats. In: HÄHN, W. **Veterinary Reproductive Ultrasonography**. Schlütersche: Germany. cap.5, p.227-252, 2003.

HAGMAN, R.; LAGERSTEDT, A.; HEDHAMMAR, A.; EGENVALL, A. A breed-matched case-control study of potential risk-factors for canine pyometra. **Theriogenology**, Stoneham, V. 75, n. 7, p. 1251-1257, 2011.

HERATH, S.; LILLY, S.T.; SANTOS, N.R.; GILBERT, R.O.; GOETZE, L.; BRYANT, C.E.; WHITE, J.O.; CRONIN, J. SHELDON, I.M. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**. London, v.7, n. 55, 2009.

HOLST, B. S.; GUSTAVSSON, M. H.; LILLIEHÖÖK, I.; MORRISON, D.; JOHANNISSON, A. Leucocyte phagocytosis during the luteal phase in the bitches. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.153, p.77-82, 2013.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.46, n.3, p. 255-259, 2005.

KREKELER, N.; MAREND, M.S.; BROWNING, G.F.; HOLDEN, K.M.; CHARLES, J.A.; WRIGHT, P.J. Uropathogenic virulence factor FimH facilitates binding of uteropathogenic *Escherichia coli* to canine endometrium. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 35, n.5, p. 461-467, 2012.

LEVY, C. E. Detecção e identificação bactérias de importância médica. In: LEVY, C. E. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde, Módulo V**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, 2004. 93 p.

MAKSIMOVIC, A.; MAKSIMOVIC, Z.; FILIPOVIC, S.; BESIROVIC, H.; RIFATBEGOVIĆ, M. Vaginal and uterine bacteria of healthy bitches during different stages of their reproductive cycle. **Veterinary Record**, London, v. 171, n.15, 2012.

MARTINS, D. G. Complexo hiperplasia endometrial cística/piometra: fisiopatogenia, características clínicas, laboratoriais e abordagem terapêutica. Jaboticabal. Unesp-Jaboticabal, 2007.

MARTIN-HIRSCH, P.; JARVIS, G.; KITCHENER, H.; LILFORD, R. Collection devices for obtaining cervical cytology samples. **Cochrane Database Syst Rev**, Oxford, 2007.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. 2 ed. Belo Horizonte: Guanabara Koogan, 2003. 133p

OLSON, P. N.; MATHER, E. C. Canine vaginal and uterine bacterial flora. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 172, p. 708-711, 1978.

OLSON, P. N.; THRALL, M.A.; WYKES, P. M. Vaginal cytology: Part I. A useful tool for staging the canine estrous cycle. **Compend Contin Educ Pract** v. 6 p. 288-297, 1984.

PRETZER, S. D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: a review. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, n.3, p. 359-363, 2008.

SANDHOLM, M.; VASENIUS, H.; KIVISTÖ, A-K. Pathogenesis of canine pyometra. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 167, n. 11, p. 1006-1010, 1975.

SCHLAFER, D. H.; GIFFORD, A. T. Cystic endometrial hyperplasia, pseudoplacental endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. **Theriogenology**, Stoneham, v.70, n.3, p.349-358, 2008.

SHARIF, H.; HAGMAN, R.; WANG, L.; ERIKSSON, S. elevation of serum thymidine kinase 1 in bacterial infection: canine pyometra. **Theriogenology**, Stoneham, v.79, p. 17 – 23, 2013

SHELDON, I. M.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SCHUBERTH, H.J. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biology of reproduction**. New York, v.81, n. 6, p. 1025 – 1032, 2009.

SCHULTHEISS, P. C.; JONES, R. L.; LYNNE KESEL, M.; OLSON, P. N. Normal bacterial flora in canine and feline uteri. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, cidade, v.11, p. 560-562, 1999

SCHLAFER, D. H; GIFFORD, A. T. CYSTIC endometrial hyperplasia, pseudoplacental endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. **Theriogenology**, Stoneham, v.70, p.349-358, 2008.

SIQUEIRA, A. K. **Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção de trato urinário, piometra e fezes de cães.** 111f. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

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

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais.** 3.ed. São Paulo: Manole, 2007.cap. 98. p. 1487-1520.

STUDER, E.; MORROW, D. A. Postpartum evalution of bovine reproductive potential: Comparison of findings from genital tract examination per rectum uterine culture and endometrial biopsy. **Jounal American Veterinary Medicine Association**, n. 172, p.489-494, 1978.

SUGIURA, K.; NISHIKAWA, M.; ISHIGURO, K.; TAJIMA, T.; INABA, M.; TORII, R.; HATOYA, S., WIJEWARDANA, V.; KUMAGAI, D.; TAMADA, H.; SAWADA, T.; IKERA, S.; INABA, T. Effect of ovarian hormones on peridical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. **Immunobiology**, v.209, p. 619-627, 2004.

TOLOSA, E. M. C., RODRIGUES, C. J., BEHMER, O. A., FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** 2 ed. Barueri, Editora Manole, 2003, 331p.

TSUMAGARI, S.; ISHINAZAKA, T.; KAMATA, H.; OHBA, S.; TANAKA, S.; ISHII, M. Induction of canine pyometra by inoculation of *Escherichia coli* into the uterus and its relationship to reproductive features. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.87, n.3, p.301-308, 2005.

VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERSTEGEN-ONCLIN, K. Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and

assessment of future reproductive success. **Theriogenology**, Stoneham, v.70, n.3, p.364-374, 2008.

VIEIRA, S. **Bioestatística-Tópicos Avançados**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2003.

VOLPATO, R.; MARTIN,I.; RAMOS, R. S.; TSUMENI, M.H.; LAUFER-AMORIN, R.; LOPES, M.D. Imunohistoquímica de útero e cérvix de cadelas com diagnóstico de piometra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 64, n.5, p. 1109-11117, 2012.

WATTS, J.L; WRIGHT, P.J; LEE, C.S. Endometrial cytology of the normal bitch throughout the reproductive cycle. **Journal of small animal practice**, Oxford, n. 39, p. 2-9, 1998.

WATTS, J. R.; WRIGHT, P. J.; WHITHEAR, K. C. Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 37, p. 54-60, 1996.

WEISS, R. R.; CALOMENO, M. A.; SOUSA, R. S.; BRIERSDORF, S. M.; CALOMENO, R. A.; MURADÁS, P. Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 81 – 87, 2004.

WHITEHEAD, M. L. Risk of pyometra in bitches treated for mismating with low doses of oestradiol benzoate. **Veterinary Record**, London, v.162, n. 23, p.746-749, 2008.