



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

REBECA CORDEIRO JUSTINO

**ESTRATÉGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES  
UTERINAS EM CADELAS**

REBECA CORDEIRO JUSTINO

**ESTRATÉGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES  
UTERINAS EM CADELAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Mello  
Martins

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Justino, Rebeca Cordeiro.

Estratégias para a identificação de alterações uterinas em cadelas / Rebeca Cordeiro Justino. - Londrina, 2018.  
116 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Mello Martins.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2018.  
Inclui bibliografia.

1. Reprodução animal - Tese. 2. Teriogenologia de pequenos animais - Tese. 3. Fisiopatologia da reprodução - Tese. I. Martins, Maria Isabel Mello. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

REBECA CORDEIRO JUSTINO

**ESTRATÉGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES  
UTERINAS EM CADELA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Mello  
Martins  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula F. R. L. Bracarense  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Ferreira De Souza  
Universidade Estadual Paulista – Botucatu

---

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros  
Universidade Estadual do Norte do Paraná –  
UENP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Denise Lopes  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Londrina, 20 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho à minha família,  
razão maior da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, sempre presente, trazendo paz e esperança ao meu coração nos momentos difíceis e de insegurança. A cada nova etapa tenho aprendido e entendido Seu ensinamento que está em II Co12.9: "Minha graça é suficiente para você, pois o meu poder se aperfeiçoa na fraqueza".

Ao meu marido Frederico, meu amado reizinho. Faço questão de abraçar seus sonhos porque ele me apoia em todas as situações. Sempre digo que ele é a razão da minha vida, não só no sentido romântico da expressão, mas porque ele me traz equilíbrio e paz. Muitas vezes abriu mão de seu descanso depois de uma semana cansativa de trabalho para que eu pudesse trabalhar. Um excelente pai, ama e cuida muito bem de nossa Maria Luiza. Esse projeto também é dele.

À minha Maria Luiza, que cedeu parte do seu precioso tempo com a mamãe. Minha companheira nesse período tão conturbado, maravilhoso e cheio de novas descobertas. Com ela aprendi o que é amar mais a alguém do que a mim mesma, aprendi que é possível viver dormindo bem pouco e que se pode ter paciência mesmo quando nada dá certo, aprendi que a gente sempre pode ser uma versão melhor de nós mesmos e que a realização da vida está nas pequenas conquistas do dia-a-dia.

Agradeço à minha orientadora, profi Bel. Abraçou todas as surpresas que apareceram em minha vida e novamente andou mais uma milha comigo. Sem sua dedicação, paciência, insistência e muitas idéias para substituir todo nosso planejamento, com certeza não teria conseguido prosseguir e finalizar esse projeto.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por sempre me incentivarem a priorizar os estudos e a adquirir conhecimento. Agradeço à minha mamis que dispôs de seu tempo para cuidar de meu bem mais precioso, que aguentou minha impaciência e nervosismo, sempre disponível, sempre alegre. Agradeço ao meu pai por todos os conselhos, as conversas e por sempre me fazer enxergar além das limitações e empecilhos.

À toda minha família, meus avós, tios, primos, todos que de alguma maneira participaram do meu crescimento e formação do meu caráter. Em especial à

minha irmã Anna Carolina, que nesse período aprendeu a ser tia, adulta e mesmo assim continua sendo minha nena.

À professora Ana Paula Bracarense pelas orientações, pela disponibilização do Laboratório de Patologia Animal para realização de grande parte do experimento e pela importante contribuição na banca de qualificação. Nunca poderei retribuir tudo que fez por mim. Agradeço pelo seu impecável tratamento para comigo, oferecendo sua atenção e assistência sempre que necessário.

À professora Carmen Hilst, presente em minha vida desde a graduação. Sua contribuição foi fundamental e sem sua ajuda e disposição esse trabalho não seria possível. Exemplo de profissional e pessoa.

Aos companheiros de projeto Rafael Bernardes, Luiz Guilherme Trautwein Corsi, Ana Paula da Silva, Juliana Torres Tomazi Fritzen e Elizangela Olegário e a todos que, de alguma maneira, contribuíram para realização dos experimentos. Muito obrigada por toda ajuda, pela paciência e pelo tempo investido.

Às professoras Alice Fernandes Alfieri e Lucienne Garcia Pretto Giordano por ceder tanto recursos físicos quanto por contribuir com suas experiências e conhecimento.

À querida Helenice, secretária do Programa de pós-Graduação em Ciência Animal e anjo da guarda em tempo integral. Em inúmeros momentos fez muito além de seu trabalho e com sua dedicação e bondade me ajudou a chegar até aqui.

Ao prof. Lucas Alécio Gomes e dra. Kátia Cristina Silva Santos, participantes da banca de qualificação, pelo tempo investido para corrigir e pela grande contribuição dada ao trabalho.

Ao programa de pós graduação em ciência animal, pelo auxílio financeiro.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela bolsa de doutorado, sem o qual este trabalho não seria realizado.

**“Toda boa dádiva e todo dom perfeito vêm do alto, descendo do Pai das luzes, que não muda como sombras inconstantes.”**

**Tiago 1:17**

JUSTINO, Rebeca Cordeiro. **Estratégias para a identificação de alterações uterinas em cadelas**. 2018. 116 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

As causas de infertilidade nas cadelas são variadas, pois a fertilidade exige normalidade no ciclo estral e um trato reprodutor saudável. Entre as causas de falhas reprodutivas podem ser citados os fatores inflamatórios e infecciosos, que muitas vezes se apresentam de forma subclínica. O objetivo deste trabalho foi investigar a associação entre agentes infecciosos e alterações histológicas e imunohistoquímicas no útero de cadelas aparentemente híginas. Para tanto, foram utilizadas 40 cadelas, provenientes de um projeto de castração ara controle de natalidade. Foram realizadas citologia vaginal, cultura uterina, morfohistologia uterina e ovariana, morfometria uterina, contagem de células inflamatórias endometriais e imunohistoquímica para ciclooxygenase 2 (COX-2) dos fragmentos uterinos. Também foi realizado PCR e soroneutralização de swabs vaginais e oculares para detecção de Herpesvírus canino e teste de imunodifusão em gel de ágar para detecção de anticorpos contra *Brucella canis*. Foram utilizados para as análises as variáveis do histórico geral e reprodutivo e os resultados da PCR e sorologia para herpesvirus canino e *Brucella canis*, submetidos ao programa IBM SPSS para o estabelecimento de fatores de risco relacionados a detecção desses patógenos ( $p < 0,05$ ). A pesquisa de anticorpos para *Brucella canis* e PCR para Herpesvirus foi negativa para todos os animais presentes no estudo. A soroneutralização para herpesvírus mostrou resultados positivos em 67,5% (27/40) das cadelas, com titulação entre 2 e 32. Os resultados das avaliações histológicas uterinas demonstraram que metade das fêmeas apresentou algum tipo de alteração uterina. As afecções mais frequentes foram hiperplasia endometrial cística (40%; 8/20) e endometrite (70%; 14/20), sendo que alguns animais apresentavam afecções concomitantes. Foi observada diferença significativa entre as contagens de linfócitos ( $p < 0,000001$ ) e plasmócitos ( $p < 0,0004$ ) presentes na camada superficial do endométrio quando comparados os animais com afecções uterinas inflamatórias e animais púberes sem afecção. A imunomarcagem para COX-2 foi mais acentuada e extensa nos quadros agudos, os quais maior número de neutrófilos em camada superficial de endométrio, edema e congestão foram verificados. Conclui-se que não houve associação entre os fatores de risco e os resultados da soroneutralização, e que a razão endométrio/miométrio uterina, a contagem de células inflamatórias infiltradas em endométrio uterino e a imunomarcagem da COX-2 em endométrio canino se mostraram eficazes no auxílio do diagnóstico de afecções uterinas e na diferenciação entre alterações inflamatórias e não inflamatórias.

**Palavras-chave:** Brucelose. Ciclooxygenase. Células inflamatórias. Herpesvirus canino. Infertilidade.

JUSTINO, Rebeca Cordeiro. **Strategies for identification of uterine alterations in bitches**. 2018. 116 p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

The cause of infertility in dogs are varied, since fertility requires normal oestrus cycle and a healthy reproductive tract. Among the causes of reproductive failure may be mentioned inflammatory and infectious factors, which often appear subclinically. The objective of this study was to investigate the association between infectious agents and histological and immunohistochemical changes in the uterus of apparently healthy bitches. Bitches (n=40) from a birth control project were used. Vaginal cytology, uterine culture, ovarie and uterine morphology, uterine morphometry, endometrial immune cell counts, and cyclooxygenase 2 (COX-2) immunohistochemistry of the uterine fragments were performed. It was also performed PCR and seroneutralization of vaginal and ocular swabs for canine herpesvirus detection and agar gel immunodiffusion test for the detection of antibodies against *Brucella canis*. General and reproductive history variables were analyzed together with the results of canine herpesvirus and *Brucella canis* and submitted to the IBM SPSS program for the establishment of risk factors related to the detection of these pathogens ( $p < 0.05$ ). Antibody screening for *Brucella* spp and PCR for herpesvirus was negative for all animals in the study. Seroneutralization for herpesvirus showed positive results in 67.5% (27/40) of he bitches, with titration between 2 and 32. The results of histological uterine evaluations showed that half of the femeals had some type of uterine alteration. The most frequent diseases were cystic endometrial hyperplasia (40%, 8/20) and endometritis (70%, 14/20), and some animals had concomitant diseases. A significant difference was observed between lymphocyte counts ( $p < 0.0000$ ) and plasma cells ( $p < 0.0004$ ) present in the superficial layer of the endometrium when compared animals with inflammatory uterine conditions to pubertal animals without affection. The most marked and extensive COX-2 immunostaining occurred in the acute series, where a higher number of neutrophils in the superficial layer of the endometrium, edema and congestion were verified. It is concluded that there was no association between the risk factors and the serum neutralization results, and the endometrial / uterine myometrial ratio, the count of immune cells infiltrated in the uterine endometrium and the COX-2 immunostaining in the endometrium have been shown to be effective to diagnose uterine conditions and to differentiate inflammatory and non-inflammatory changes.

**Keywords:** Brucellosis. Cyclooxygenase. Canine Herpesvirus. Immune cells. Infertility.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO A

- Figure 1** - Variables from a group of 40 bitches submitted to elective ovariectomy in a massive sterilization program in the central eastern region of the State of Paraná, according to data obtained from the general and reproductive history .....55

### ARTIGO B

- Figura 1** - Histologia ovariana e citologia vaginal em diferentes fases do ciclo estral de cadelas submetidas a castração eletiva .....74
- Figura 2** - Imunomarcção para COX-2 de células inflamatórias do estroma endometrial de cadelas sem alterações uterinas em diferentes fases do ciclo estral .....77

### ARTIGO C

- Figura 1** - Alterações histológicas em úteros de cadelas submetidas à ovariectomia eletiva .....95
- Figura 2** - Infiltrado inflamatório anormal em endométrio canino .....96
- Figura 3** - Imunomarcção de COX-2 de endométrio uterino de cadelas submetidas a castração eletiva .....96
- Figura 4** - Imunomarcção de COX-2 em endométrio uterino de cadelas .....97

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO A

- Tabela 1 -** Definition of puberty and estrous cycle stages classification from a group of bitches submitted to elective ovariectomy in the central eastern region of the State of Paraná, according to vaginal cytology and ovarian histology.....53
- Tabela 2 -** CaHV-1 serum neutralization positive and negative distribution of the variables studied from a group of 40 bitches submitted to elective ovariectomy in a massive sterilization program in the central eastern region of the State of Paraná and respective Pearson Chi-Square test p-values.....56
- Tabela 3 -** CaHV-1 serum neutralization positive and negative distribution of the variables studied from a group of 40 bitches submitted to elective ovariectomy in a sterilization program in the central eastern region of the State of Paraná and respective odds ratio (OR), 95% confidence interval (CI 95%) and, when necessary, the Fisher's exact test p-values.....56

### ARTIGO B

- Tabela 1 -** Distribuições das fases do ciclo estral em diferentes grupos de variáveis presentes no histórico geral e reprodutivo, de cadelas híginas submetidas à ovariectomia eletiva .....75
- Tabela 2 -** Média ( $\pm$  desvio padrão) das espessuras camada muscular circular e mediana (mín - máx) das espessuras da camada muscular longitudinal e estrato vascular de útero de cadelas híginas pré-púberes e púberes em diferentes fases do ciclo estral .....75
- Tabela 3 -** Média ( $\pm$  desvio padrão) das espessuras do endométrio, camada muscular total e parede uterina de útero de cadelas híginas pré-púberes e púberes em diferentes fases do ciclo estral .....76

<b>Tabela 4 -</b>	Média ( $\pm$ desvio padrão) e mediana (mín - máx) dos valores referentes ao número de células inflamatórias presentes na camada superficial do endométrio em cadelas hígdas pré-púberes e púberes em diferentes fases do ciclo estral .....	76
<b>Tabela 5 -</b>	Média ( $\pm$ desvio padrão) e mediana (mín - máx) dos valores referentes ao número de células inflamatórias presentes no endométrio total em cadelas hígdas pré-púberes e púberes em diferentes fases do ciclo estral .....	76
<b>Tabela 6 -</b>	Média ( $\pm$ desvio padrão) dos valores referentes às contagens de células inflamatórias do estroma endometrial imunomarcadas para COX-2 e a mediana (mín - máx) de suas respectivas intensidades de marcação, em cadelas hígdas pré-púberes e púberes .....	77
<b>ARTIGO C</b>		
<b>Tabela 1 -</b>	Parâmetros estabelecidos e seu respectivo grau de severidade para a avaliação dos cortes uterinos de cadelas clinicamente saudáveis .....	92
<b>Tabela 2 -</b>	Distribuições das alterações uterinas (endometrite, HEC e HEC com endometrite) e animais sem alterações, diagnosticadas pela histomorfologia nas fases do ciclo estral de cadelas .....	97
<b>Tabela 3 -</b>	Distribuições das alterações uterinas: endometrite, HEC e HEC com endometrite, diagnosticadas pela histomorfologia em cadelas em diferentes grupos de variáveis presentes no histórico geral e reprodutivo .....	98
<b>Tabela 4 -</b>	Medianas (mín - máx) e médias ( $\pm$ desvio padrão) referentes às avaliações histomorfométricas uterinas de cadelas pré-púberes e púberes, com e sem alterações uterinas diagnosticadas na histomorfologia .....	99
<b>Tabela 5 -</b>	Medianas (mín - máx) referentes aos valores da contagem de células inflamatórias endometriais na camada superficial, de cadelas pré-púberes e púberes, com e sem alterações uterinas diagnosticadas na histomorfologia .....	99

<b>Tabela 6 -</b>	Medianas (mín - máx) referentes aos valores da contagem de células estromais imunomarcadas pela COX-2 e intensidade de marcação dessas células, e média ( $\pm$ desvio padrão) referente ao escore lesional de cadelas pré-púberes e púberes, com e sem alterações uterinas diagnosticadas na histomorfologia .....	100
<b>Tabela 7 -</b>	Medianas (mín - máx) e médias ( $\pm$ desvio padrão) referentes às avaliações histomorfométricas uterinas em cadelas em diferentes fases do ciclo estral, com e sem alterações uterinas diagnosticadas na histomorfologia .....	100
<b>Tabela 8 -</b>	Medianas (mín - máx) referentes aos valores da contagem de células inflamatórias endometriais na camada superficial, de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, com e sem alterações uterinas diagnosticadas na histomorfologia .....	101
<b>Tabela 9 -</b>	Medianas (mín - máx) referentes aos valores da contagem de células estromais imunomarcadas pela COX-2 e intensidade de marcação dessas células, e média ( $\pm$ desvio padrão) referente ao escore lesional de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, com e sem alterações uterinas diagnosticadas na histomorfologia.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaHV-1	Herpesvirus Canino tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HEC	Hiperplasia Endometrial Cística
HEP	Hiperplasia Endometrial pseudo-placentacional
LH	Hormônio Luteinizante
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
OHE	Ovariohisterectomia
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE	Prostaglandina E
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 Alpha
PGH2	Prostaglandina H2
TCID	<i>Tissue culture infection dose</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....	18
2.1	MORFOFISIOLOGIA REPRODUTIVA DA CADELA.....	18
2.1.1	Fases do Ciclo Estral e suas Particularidades.....	19
2.1.1.1	Proestro .....	19
2.1.1.2	Estro .....	21
2.1.1.3	Diestro .....	22
2.1.1.4	Anestro .....	25
2.2	INFERTILIDADE NA CADELA .....	27
2.3	AFECÇÕES REPRODUTIVAS .....	28
2.3.1	Endometrite .....	29
2.3.2	Complexo Hiperplasia Endometrial Cística - Piometra .....	31
2.3.3	Adenomiose .....	33
2.3.4	Brucelose.....	34
2.3.5	Herpesvirose .....	35
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	46
3.1	OBJETIVO GERAL .....	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
<b>4</b>	<b>ARTIGO A - CANINE HERPESVIRUS TYPE I AND <i>Brucella canis</i> SURVEY AND RISK FACTORS STUDY IN PREPUBERTAL AND PUBERTAL BITCHES SUBMITTED TO ELECTIVE OVARIOHYSTERECTOMY</b> .....	47
	<b>ABSTRACT</b> .....	48
	<b>INTRODUCTION</b> .....	49

	<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	50
	<b>RESULTS</b> .....	54
	<b>DISCUSSION</b> .....	57
	<b>REFERENCES</b> .....	59
<b>5</b>	<b>ARTIGO B - CARACTERIZAÇÃO IMUNO- HISTOMORFOMÉTRICA DO ÚTERO DE CADELAS HÍGIDAS PRÉ-PÚBERES E PÚBERES</b> .....	66
	<b>RESUMO</b> .....	67
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	68
	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	69
	<b>RESULTADOS</b> .....	73
	<b>DISCUSSÃO</b> .....	78
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80
<b>6</b>	<b>ARTIGO C - IMUNO-HISTOMORFOLOGIA NA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES UTERINAS EM CADELAS SUBMETIDAS À OVARIOHISTERECTOMIA ELETIVA</b> .....	85
	<b>RESUMO</b> .....	86
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	87
	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	89

<b>RESULTADOS</b> .....	94
<b>DISCUSSÃO</b> .....	102
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	107
<b>7 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	113
<b>ANEXOS</b> .....	114
ANEXO A – Certificado do Comitê de ética .....	115
ANEXO B – Certificado correção de inglês - Artigo 1 .....	116

## 1 INTRODUÇÃO

A cinofilia está mais especializada, sendo necessária a busca constante por conhecimentos teóricos e práticos envolvidos no bem-estar e na manutenção da sanidade animal. O cão tem sido mais requisitado para o desempenho de atividades de utilidade pública e cada vez mais é visto como membro da família por seus tutores. Devido a esses fatores, a criação de cães como atividade econômica tem crescido. Tanto para criadores quanto para seus tutores a sanidade geral e reprodutiva da espécie é importante, representando aumento de ganho para este setor da economia e melhor qualidade de vida para os animais.

Em uma pesquisa solicitada pela Abinpet verificou-se que apenas 22% dos proprietários possuíam cães sem raça definida. Os 78% restantes possuíam animais de raça pura, provenientes, em grande parte, de criatórios (MELO, 2016). A falta de fiscalização, organização e unificação do setor de criação de cães no Brasil, dificulta o levantamento de dados precisos sobre a criação comercial, assim como informações sobre a sanidade dos reprodutores. Um dos marcadores mais importantes para os canis é a taxa de fertilidade, entretanto esse é um indicador difícil de ser determinado. Dados de clubes de criadores podem ser discrepantes de dados obtidos em estudos de fertilidade controlados.

A fertilidade exige normalidade no ciclo estral e um trato reprodutor saudável, sendo a falta de conhecimento da fisiologia para o monitoramento do ciclo estral a causa mais frequente de falhas reprodutivas na cadela. Entretanto, as afecções uterinas inflamatórias e infecciosas também podem ser considerados como importantes fatores e, por isso, devem ser investigados.

De acordo com Schlafer (2012), na espécie canina, é necessário padronizar tanto a colheita de amostra quanto a interpretação de resultados provenientes de técnicas já bem utilizadas para o diagnóstico e estadiamento de lesões uterinas em outras espécies. Devido a esta necessidade, o objetivo deste trabalho foi avaliar imunohistologicamente o trato reprodutor de cadelas híginas submetidas a castração eletiva, assim como estabelecer fatores de risco para infecção por herpesvírus e *Brucella canis*.

## 2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 2.1 MORFOFISIOLOGIA REPRODUTIVA DA CADELA

As cadelas são monoéstricas, predominantemente não estacionais, e poliovulatórias, tendo ovulações espontâneas seguidas de uma fase lútea e anestro obrigatório até o surgimento de novo ciclo (JÖCHLE; ANDERSEN, 1977; CONCANNON et al., 2011). Diferente das outras espécies domésticas, as cadelas ovulam oócitos primários e a maturação ocorre na tuba uterina, dois dias após a ovulação (HOLST; PHEMISTER, 1971). Embora sejam consideradas predominantemente não sazonais, alguns estudos demonstram certa interferência das estações no número de estros e taxa de partos (CHATDARONG et al, 2007; CHRISTIE; BELL, 1971)

A puberdade ocorre entre seis a 14 meses de idade, na maioria das raças, e está associada ao momento em que a cadela alcança um platô de crescimento (SOKOLOWSKY, 1977). É importante ressaltar que cadelas pubescentes podem não apresentar comportamento de estro, mesmo quando há ovulação (WILDT; SEAGER; CHAKRABORTY, 1981). Há também maior propensão a apresentar *split heat*, o qual é observado sinais de proestro-estro sem ovulação seguido do estro verdadeiro após intervalo de dias ou semanas (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001b). O ovário pré-púbere apresenta folículos primários e secundários (SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973). Os folículos antrais, que regridem em grande parte, são evidentes aos 5-6 meses de idade e são caracterizados por uma forma irregular e numerosas células da granulosa apoptóticas (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007). O endométrio das cadelas pré-puberes se apresenta imaturo, com estroma delicado, poucas glândulas aparentes e o miométrio está subdesenvolvido (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007).

O intervalo interestro consiste no período entre o início de um proestro até o início do proestro subsequente (CHATDARONG et al, 2007). Parece haver grande variação nesse intervalo, tanto entre fêmeas quanto entre os ciclos de uma mesma fêmea, sendo raça e ambiente considerados causas de variação (CHATDARONG et al, 2007; CHRISTIE; BELL, 1971; LINDE-FORSBERG; WALLÉN, 1992). Ainda não está bem definido se a gestação pode aumentar significativamente

o intervalo entre ciclos, haja vista que existem autores que observaram interferência e outros não (CHRISTIE; BELL, 1971; SOKOLOWSKY, 1977).

Os estágios do ciclo e suas fases funcionais correspondentes são o proestro, estro, diestro e o anestro (HEAPE, 1900; JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001b; MARSHALL; JOLLY, 1906).

## 2.1.1 Fases do Ciclo Estral e suas Particularidades

### 2.1.1.1 Proestro

O proestro se inicia quando são observados os sinais de estrogenização, como edema de vulva e secreção vulvar serosanguinolenta (BEACH; DUNBAR; BUEHLER, 1982). A duração média dessa fase é de 9 dias, podendo variar de 0 a 27 dias (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001b).

As fêmeas no proestro atraem os machos, porém, mesmo já apresentando alguns sinais como desvio lateral de cauda, elevação da vulva em resposta ao toque da região perineal e o desvio lateral dos quartos posteriores em resposta ao toque na pele à direita ou à esquerda da vulva, ainda não se apresentam receptivas à cópula, demonstrando comportamento agressivo (BEACH; DUNBAR; BUEHLER, 1982). As fêmeas ainda se mostram inquietas, com hiporexia, polidipsia e poliúria (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007). À vaginoscopia, a mucosa aparece edematosa, mudando progressivamente de rosada para pálida, com fluido serosanguinolento na superfície e nas reentrâncias das pregas vaginais, que se tornam mais proeminentes em ambos os eixos (CONCANNON et al., 2011). No início do proestro são observados vários tipos de células epiteliais e hemácias no esfregaço vaginal, seguido de um aumento progressivo de células intermediárias grandes e células superficiais, podendo ainda haver presença de neutrófilos e bactérias (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001b).

No início do proestro, observa-se uma série de pequenas ondas de hormônio luteinizante (LH) e o pico pré-ovulatório tem uma duração de 24 a 72 horas (HOFFMANN; RIESENBECK; KLEIN, 1996). O estrógeno sérico aumenta progressivamente, variando de 5 a 15 pg/mL (~20–55 pmol/L) até picos de 40 a 120 pg/mL (~150–450 pmol/L) (CONCANNON et al., 2011). A concentração de progesterona sérica se mantém em níveis basais (<1 a 2ng/mL) até o final do

proestro, momento que ocorre aumento, provavelmente relacionado à luteinização folicular pré-ovulatória (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001b; PHEMISTER et al., 1973).

Os folículos antrais ovarianos são mais numerosos durante o proestro, passando pela maturação de folículos secundários para pré-ovulatórios (ENGLAND; RUSSO; FREEMAN, 2009; SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973). Folículos antrais grandes apresentam camadas de pequenas células da granulosa com aspecto basofílico formam a parte interna da parede folicular, que é cercada por células alongadas e capilares da teca (GROPETTI et al., 2015; REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007). A medular ovariana se apresenta edematosa e congesta (AYDIN; DOĞAN; TIMURKAAN, 2013). Ainda é possível observar corpos lúteos atrésicos de ciclos anteriores (AYDIN; DOĞAN; TIMURKAAN, 2013; REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007). Prostaglandinas e luteólise

O útero por sua vez também passa por inúmeras mudanças durante o ciclo estral. Desde o primeiro dia do proestro se observa um edema intersticial marcante e aumento da altura das glândulas endometriais, com intensa hipertrofia, moderada hiperplasia e desenvolvimento de grande número de vacúolos secretórios (BARRAU et al., 1975). Extenso extravasamento de hemácias ocorre na porção superficial do endométrio acompanhado de uma grande quantidade de macrófagos (BARRAU et al., 1975). De acordo com Pires e Payan-Carreira (2015), durante essa fase os macrófagos se apresentam espalhados difusamente no estroma endometrial, sendo sua quantidade sete vezes maior em cadelas em fase de involução uterina tardia. Os linfócitos também estão igualmente distribuídos pelo estroma endometrial, sendo o linfócito T observado em maior quantidade no proestro (PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015). O miométrio parece mais desenvolvido com o aumento do tamanho das células musculares lisas, tornando-se cada vez mais eosinofílico ao exame microscópico (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007).

As mudanças uterinas não se restringem a quantidade e tipo celular observado em endométrio, mas também ao metabolismo dessas células. A ciclooxigenase (COX) é reconhecida como enzima participante da biossíntese das prostaglandinas (PG), e sua isoforma COX-2 pode ser expressa em inúmeros tipos de células em resposta a vários indutores, como fatores de crescimento, citocinas e moléculas pró-inflamatórias (HINZ; BRUNE, 2002; ROONGSITTHICHAI et al., 2011). A maioria dos estudos em cadelas que envolvem produção e expressão de

ciclooxigenase 2 em endométrio, assim como os que estão relacionados à produção de prostaglandina, focaram apenas nas fases de diestro e anestro (LUZ et al., 2006; SILVA et al., 2009; VEIGA et al., 2017; VOLPATO, 2015). Volpato (2015) pesquisou a imunomarcção da COX-2 em cérvix de cadelas saudáveis em fase folicular, mas não definiu se estavam no estro ou no proestro. Foi observada imunomarcção no epitélio luminal, na região glandular e na região muscular, sem diferença nas cadelas com piometra (VOLPATO, 2015).

#### 2.1.1.1 Estro

O início do estro é caracterizado pela aceitação da cobertura e pelo pico de LH (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001b; OLSON et al., 1982). O estro tem duração variável, apresentando uma média de nove dias (CONCANNON et al., 2011).

A fêmea alcança o pico de atratividade nesta fase e todos os comportamentos sexuais descritos no proestro são intensificados, com o adendo da aceitação de monta (BEACH; DUNBAR; BUEHLER, 1982). A vulva permanece edemaciada, porém se apresenta mais macia e o corrimento vaginal se mostra em menor quantidade de hemácias na maioria das cadelas, com cor de palha (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001b). À vaginoscopia é possível observar a diminuição do edema da mucosa vaginal, com pregas menos angulosas no início do estro, até mais angulares no final deste período e com coloração pálida (REDDY et al., 2011). Na citologia vaginal os neutrófilos estão normalmente ausentes, as hemácias estão em quantidade reduzida do que a observada no proestro, as células epiteliais superficiais sem núcleo são predominantes (>90) e há presença de bactérias sem que isso indique qualquer afecção (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001b).

A ovulação ocorre 24 a 72 horas após o pico de LH, e este volta a concentrações basais após esse aumento (OLSON et al., 1982; PHEMISTER et al., 1973). No estro, o estrógeno continua a diminuir, alcançando valores intermediários de 10-20 pg/mL. Em contrapartida, a progesterona sérica aumenta rapidamente acima de 1-3ng/mL, acompanhando o pico de LH e, após ovulação, aumenta novamente atingindo 10-25 ng/mL (CONCANNON et al., 2011).

As cadelas no estro possuem inúmeros folículos pré-ovulatórios, com 3 a 14 mm de diâmetro e em sua maioria luteinizados (SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973). As paredes dos folículos são formadas por camadas estratificadas de células alongadas da granulosa, que protruem para dentro do espaço antral e se tornam bem evidentes (AYDIN; DOĞAN; TIMURKAAN, 2013). Após a ovulação, capilares da teca penetram na membrana basal, para dentro das camadas de células luteinizadas da granulosa (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007).

Durante o fim do proestro e começo do estro, o crescimento e desenvolvimento glandular do endométrio uterino de cadelas atinge um platô, seguido de uma segunda e mais intensa onda de crescimento (BARRAU et al., 1975). Pode-se observar também o desenvolvimento de inúmeras e amplas microvilosidades na borda apical das células epiteliais glandulares, principalmente na região de criptas (BARRAU et al., 1975). No início do estro, o endométrio uterino ainda se apresenta edemaciado e, após a ovulação, há diminuição do edema e aumento do colágeno estromal (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007). O tecido conjuntivo da lâmina própria se mostra mais denso e ainda é possível observar extravasamento de hemácias (SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973).

Ao final do estro, as glândulas endometriais da região basal se apresentam mais espiraladas e as da região de criptas estão levemente mais alongadas e espiraladas (BARRAU et al., 1975). Nesta fase, os macrófagos podem ser observados nas proximidades das glândulas endometriais, entretanto, não há intenso acúmulo peri-glandular, o qual somente é observado em casos de afecções uterinas (PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015). Os linfócitos, assim como no proestro, se apresentam igualmente distribuídos por todas as camadas do endométrio (PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015). Existe continuação da proliferação e hipertrofia celular do músculo liso do miométrio (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007).

#### 2.1.1.1 Diestro

O diestro é a parte pós-estro da fase luteal, inicialmente detectada pela alteração comportamental da fêmea e atualmente definida pela mudança característica que ocorre na citologia vaginal (CONCANNON et al., 2011). Todas as

cadelas passam por uma fase luteal prolongada, tendo ocorrido o acasalamento ou não, independente da gestação (KUSTRITZ, 2012).

Nesta fase, observa-se o término dos comportamentos presentes no estro (BEACH; DUNBAR; BUEHLER, 1982). A secreção vulvar diminui, sendo possível observar uma pequena descarga mucoide no início do diestro. As mudanças físicas incluem desenvolvimento mamário e, em algumas cadelas, aparente aumento abdominal, mesmo nos animais não gestantes (KUSTRITZ, 2012). O começo do diestro é marcado pela diminuição e arredondamento das pregas vaginais e a mucosa apresenta áreas rosadas e áreas pálidas (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001b; REDDY et al., 2011). No esfregaço vaginal, ocorre uma mudança abrupta no número relativo dos tipos de células epiteliais, com diminuição das células superficiais e o aumento das células parabasais e intermediárias pequenas (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001b).

A progesterona sérica aumenta para valores de 15-80 ng/mL entre os dias 20 e 35 do ciclo (a partir do pico de LH), e diminui lentamente depois disso, indo abaixo de 1 ng/mL nos dias 55 a 90 (CONCANNON et al., 2011). Apesar de não haver diferença entre os valores médios de progesterona sérica entre cadelas não gestantes e gestantes, existe diferença nos tempos e nas taxas em que os níveis plasmáticos diminuem para níveis não detectáveis, sendo esta queda mais abrupta durante a gestação (CONCANNON; HANSEL; VISEK, 1975). O nível de estrógeno sérico permanece relativamente constante nos ciclos sem gestação (9 a 15 pg/mL), mas aumentam em gestantes no dia 36 (27 pg/mL), permanecem elevados até dois dias de pré-parto (19 pg/mL) e diminuem rapidamente para os níveis das não gestantes até o dia do parto (11 pg/mL) (CONCANNON; HANSEL; VISEK, 1975).

No início do diestro, o corpo lúteo apresenta células em intensa divisão e com o citoplasma granular e eosinofílico, sendo possível ainda observar pequenas áreas centrais do antigo antro preenchidas com fluido proteico eosinofílico, hemácias e células inflamatórias (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007). Em folículos antrais pequenos, assim como nos corpos lúteos, foi observado infiltrado de células inflamatórias, hemácias e fluido eosinofílico (AYDIN; DOĞAN; TIMURKAAN, 2013). Na ausência de gestação, o citoplasma das células lúteas se torna cada vez mais vacuolizado (deposição de lipídeos) e a regressão do corpo lúteo se inicia em torno do dia 20 do diestro, sendo marcada pela presença de células lúteas apoptóticas (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007).

No início do diestro, o endométrio e o miométrio atingem sua maior espessura e densidade celular e o estroma se apresenta com colágeno maduro denso (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007). Para cadelas não gestantes, as glândulas endometriais apresentam intensa proliferação durante o início do diestro, com enovelamento e novas ramificações na região basal, sendo o crescimento uterino encerrado nos primeiros dias dessa fase (BARRAU et al., 1975). A camada superficial do endométrio forma inúmeras criptas pela protrusão de cristas provenientes do estroma, as quais são cobertas por células colunares altas (GALABOVA et al., 2003). Essas células são denominadas células espumosas epiteliais de superfície (*Foamy Epithelial Surface Cells*) e estão presentes na cadela no diestro e anestro, sem indicação de degeneração ou lesão (BARTEL; TICHY; WALTER, 2014). Ao longo do diestro, observam-se secreções glandulares eosinofílicas bem como depósitos intersticiais de pigmento amarelo (hemossiderina) (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007). Assim como foi observado nas outras fases, macrófagos e linfócitos se distribuem difusamente pelo estroma endometrial e, como no estro, os macrófagos são encontrados geralmente perto das glândulas endometriais (PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015).

Quando os níveis de progesterona começam a diminuir, as células epiteliais glandulares voltam rapidamente para o tamanho observado no anestro (BARRAU et al., 1975). No final do diestro, as criptas endometriais ainda são bem delineadas, com células epiteliais maiores e grande quantidade de vacúolos no citoplasma (GALABOVA et al., 2003). O endométrio se encontra consideravelmente mais delgado, principalmente nas regiões intermediária e das criptas, com grande quantidade de debris celulares no lúmen glandular e macrófagos no interstício (BARRAU et al., 1975). As células da lâmina própria e miometriais apresentam menor tamanho nesta fase e a espessura do miométrio também se apresenta diminuída quando comparada com o proestro e estro (SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973).

De acordo com Luz et al. (2006), a produção de prostaglandina F2 *alpha* (PGF<sub>2α</sub>) pelo endométrio uterino é maior em cadelas no período periparto do que em cadelas no mesmo período que não estão gestantes (65 dias após o pico de LH). Esse fato foi confirmado por Silva et al. (2009) que observaram aumento da transcrição do gene PGF sintetase no endométrio de cadelas em diestro quando comparada com cadelas em anestro. A transcrição do gene COX-2 também foi

descrita nesta fase (SILVA et al., 2009; VOORWALD et al., 2015). Pesquisas de COX-2 através da imuno-histoquímica uterina, realizada em cadelas saudáveis durante o diestro, mostraram marcações no epitélio luminal, no epitélio glandular, em células inflamatórias presentes no estroma e na camada muscular (VEIGA et al., 2017; VOLPATO, 2015).

#### 2.1.1.1 Anestro

A transição da fase luteal para o anestro é gradual e a dosagem de progesterona parece ser o melhor critério para a determinação do fim da fase luteal, sendo considerada terminada quando a progesterona sérica se encontra abaixo de 3 nmol/L (0,94ng/mL) pela primeira vez (OKKENS; KOOISTRA, 2006). A duração do anestro varia consideravelmente entre cadelas e entre os ciclos da mesma cadela (BOUCHARD et al., 1991; OKKENS; KOOISTRA, 2006).

Nesta fase, nenhum dos comportamentos presentes nas fases anteriores é observado, sendo que a cadela é não atrativa ao macho e não receptiva à cópula (BEACH; DUNBAR; BUEHLER, 1982). A vulva se mantém pequena durante o anestro, sem ou com ínfima presença de corrimento vaginal (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001b). A mucosa vaginal se apresenta fina e rosada, com capilares visíveis (CONCANNON et al., 2011). Em relação à citologia vaginal, células epiteliais parabasais e intermediárias pequenas são as mais observadas, sendo bem semelhantes a esfregaços feitos no início do proestro e no diestro, principalmente quando há ausência de neutrófilos e hemácias (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001b).

Apesar de o anestro ser considerado um período de quiescência reprodutiva, ocorrem alterações histológicas e endócrinas que são necessárias para o início do próximo ciclo (OLSON et al., 1982; SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973). No anestro nem a hipófise nem os ovários encontram-se quiescentes. O LH apresenta variação considerável durante todo o período do anestro, com concentrações médias de LH variando de 21 a 156 ng / mL (OLSON et al., 1982). O estradiol sérico é relatado também como variável, com valores baixos (5–10 pg/mL) até valores semelhantes aos encontrados no proestro (CONCANNON et al., 2011; OLSON et al., 1982). A progesterona sérica permanece abaixo de 1ng

/mL, sendo 0,4 ng/mL o valor mais baixo observado, aos 30-40 dias antes do proestro (CONCANNON et al., 2011).

Durante essa fase, o corpo lúteo continua a regredir e se direciona para a região medular ovariana, apresentando lobulações irregulares, células lúteas com grandes vacúolos citoplasmáticos e infiltração por macrófagos (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007). À medida que o corpo lúteo regride, o córtex ovariano se torna mais aparente com inúmeros folículos primários e secundários em atividade (AYDIN; DOĞAN; TIMURKAAN, 2013; SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973). Os resquícios dos corpos lúteos podem persistir por vários meses e ainda podem ser notados no próximo ciclo estral (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007).

A completa involução do útero ocorre aos 120 dias do ciclo sem gestação e 12 semanas após o parto, podendo explicar o longo período de intervalo interestral em cadelas híginas (AL-BASSAM; THOMSON; O'DONNELL, 1981; CONCANNON et al., 2011). Apesar de ocorrer involução, o útero não retorna para seu tamanho observado antes da puberdade (SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973). O comprimento e diâmetro das glândulas estão no seu ponto mais baixo e seu epitélio se apresenta colunar baixo ou cúbico em todas as três zonas endometriais (basal, intermediária e de criptas) (BARRAU et al., 1975). A contagem de macrófagos e linfócitos no endométrio se apresenta maior nesta fase e os macrófagos residentes frequentemente possuem um grande citoplasma repleto de detritos celulares, contrastando com os macrófagos em outras fases do ciclo (PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015). Algumas cadelas também podem apresentar células espumosas epiteliais de superfície em algumas regiões do epitélio luminal (BARTEL; TICHY; WALTER, 2014). Assim como no diestro, o miométrio se apresenta mais fino e essa característica não parece diferenciar quando cadelas de diferentes idades são comparadas (SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973). O endométrio, por sua vez, não apresenta significativa diminuição nesta fase, podendo indicar diferenças no índice de involução celular e no efeito seletivo da progesterona (SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973). No anestro que sucede o parto, os macrófagos estão presentes entre as glândulas endometriais em tal número que produzem bandas escuras que demarcam os locais de implantação (BARRAU et al., 1975). A proliferação de colágeno na superfície endometrial nos

locais placentários faz parte do processo de reparo da superfície epitelial ferida e desnuda (AL-BASSAM; THOMSON; O'DONNELL, 1981).

Durante o anestro, pode-se detectar produção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pelo endométrio (LUZ et al., 2006). A expressão gênica COX-2 e PGE sintetase também foram detectadas nessa fase no endométrio de cadelas saudáveis (SILVA et al., 2009). Não foram encontrados nos bancos de dados pesquisados artigos baseados na imunomarcagem de COX-2 em endométrio de cadelas híginas nessa fase do ciclo estral.

## 2.2 INFERTILIDADE NA CADELA

As causas de infertilidade nas cadelas são variadas. A fertilidade exige normalidade no ciclo estral e o trato reprodutor saudável, para que haja implantação bem sucedida na parede uterina, desenvolvimento normal dos fetos, manutenção da gestação e desencadeamento do parto. A causa mais frequente de aparente infertilidade em cães é a falta de conhecimento e controle do ciclo estral da cadela (OKKENS et al., 1992). Um estudo conduzido na França concluiu que o índice de fertilidade em cadelas de raça pura submetidas a cobertura natural ou inseminação artificial, quando submetidas à monitoramento do ciclo estral, foi de 75,4% (FONTBONNE, 2011).

A causa primária da infertilidade usualmente é investigada usando uma combinação de estratégias, incluindo perfil hormonal reprodutivo, citologia vaginal, vaginoscopia, ultrassonografia abdominal, e, em alguns casos, biópsia uterina (DAVIDSON, 2006; MIR et al., 2013).

Inflamações e infecções vaginais ou uterinas podem impedir a concepção e interromper a gestação (GIVENS; MARLEY, 2008; LINDE, 1983). A hiperplasia endometrial cística uterina também pode ser uma causa de infertilidade se as lesões císticas forem extensas e grandes, podendo interferir na distribuição dos embriões e no desenvolvimento da placenta (SCHLAFER; GIFFORD, 2008). A endometrite já foi inúmeras vezes associada à subfertilidade e infertilidade na cadela, com histórico de não concepções e abortamentos precoces (FONTAINE et al., 2009; FREEMAN; GREEN; ENGLAND, 2013; GIFFORD; SCARLETT; SCHLAFER, 2014; MIR et al., 2013). As causas infecciosas responsáveis por perdas reprodutivas nas cadelas incluem patógenos com potencial zoonótico, bem

como vírus que podem se espalhar rapidamente por um canil se as cadelas não estiverem devidamente imunizadas (GIVENS; MARLEY, 2008).

Alterações ovarianas incluem cistos e tumores, que podem causar prolongamento de estros ou diminuição do intervalo entre ciclos (GRUNDY et al., 2002). Dentre as neofomações ovarianas, o tumor de células da granulosa está entre os mais encontrados (PATNAIK; GREENLEE, 1987). Essa neoplasia se apresenta funcional na maior parte dos casos, ou seja, suas células produzem estrógeno e o animal pode apresentar sinais de hiperestrogenismo (DAVIDSON, 2006; TAVASOLI; SOLATI, 2011). Os cistos ovarianos são frequentes nas cadelas e os de maior importância para a fertilidade são os foliculares e os foliculares luteinizados, devido à produção hormonal e alteração na dinâmica do ciclo estral (DAVIDSON, 2006, ORTEGA-PACHECO et al., 2007).

As alterações genéticas podem contribuir para defeitos no embrião e malformação fetal, o que pode ocasionar a mumificação, perdas embrionárias ou abortamento (VERSTEGEN et al., 2008). Também podem atuar como promotor de algumas desordens de intersexualidade (O'CONNOR et al., 2011). Cadelas com desordens na diferenciação sexual (hermafroditas, pseudo-hermafroditas, entre outros) possuem chances mínimas de se reproduzirem (MEYERS-WALLEN, 2012).

As alterações hormonais são uma das causas mais importantes que causam infertilidade nas cadelas e, dentre essas, a mais comum é o hipotireoidismo (DAVIDSON, 2006). O hiperadrenocorticismismo também é relatado como causa de anestro persistente em cadelas devido à interferência na síntese de LH (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001a).

### 2.3 AFECÇÕES REPRODUTIVAS

Após a puberdade, o endométrio passa por inúmeros ciclos de transformações, que incluem regeneração, remodelamento e diferenciação da matriz intracelular (PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015). Devido a esses inúmeros ciclos de modificações e a intensa exposição a agentes externos, pode ocorrer o desenvolvimento de afecções.

Dentre as afecções reprodutivas relatadas em cadelas, as alterações uterinas estão entre as mais frequentes (AGUIRRA, 2013; KACHHWAHA; TANWAR; GAUR, 2010; PREVIATO et al., 2005).

### 2.3.1 Endometrite

A endometrite é descrita como a inflamação da mucosa uterina, ruptura do epitélio endometrial, infiltração de células inflamatórias, congestão vascular e edema estromal (FONTAINE et al., 2009). Pode ser classificada como aguda, sub-aguda ou crônica, dependendo do tipo e quantidade de células inflamatórias presentes no endométrio (TUMMARUK et al., 2010). É considerada uma das principais causas de infertilidade em inúmeras espécies, sendo amplamente estudada em vacas, éguas, porcas, mulheres e cadelas (ALGHAMDI et al., 2005; GILBERT et al. 2005; MIR et al., 2013; TUMMARUK et al., 2010; ZOLGHADRI et al., 2011).

Os principais fatores envolvidos no estabelecimento e manutenção dessa inflamação parece ser a presença de sêmen após cópula ou inseminação artificial e a contaminação bacteriana (FREEMAN; GREEN; ENGLAND, 2013; FONTAINE et al, 2009; KITAYA et al., 2013).

Cadelas com endometrite podem ser inférteis; podem apresentar ciclos ovarianos normais e ovulações, porém apresentam dificuldade em conceber e manter a gestação devido ao ambiente uterino anormal, que impede a implantação ou resulta na reabsorção fetal (DAVIDSON, 2006). Em um estudo realizado em um centro de reprodução, dentre 21 cadelas com histórico de não gestação após cópula/inseminação ou perda embrionária, sete foram diagnosticadas com endometrite (concomitante ou não com outras afecções) (MIR et al., 2013).

O diagnóstico da endometrite é baseado nos achados de exames citológicos provenientes de *swabs* uterinos ou lavados uterinos, e de exames histológicos de biópsias uterinas ou endometriais. A avaliação citológica tem a vantagem de ser menos invasiva, porém foram relatados casos de endometrite após uso de *swabs* uterinos e a dificuldade na determinação do número de leucócitos devido a variação de volume obtidos pelos lavados uterinos (FONTAINE et al., 2009; WATTS; WRIGHT, 1995). As colheitas de fragmentos endometriais realizadas via transcervical são regularmente utilizadas em éguas e já foram validadas para cadelas, mostrando-se tão eficazes no diagnóstico de lesões quanto a biópsia via laparotomia contendo toda a espessura da parede uterina (CHRISTENSEN et al. 2012; SNIDER; SEPOY; HOLYOAK, 2011). A técnica de biópsia de toda a extensão da parede uterina via laparotomia parece ser a mais utilizada em cadelas para o

diagnóstico histológico de sub ou infertilidade (GIFFORD; SCARLETT; SCHLAFER, 2014; MIR et al., 2013). Ambas as técnicas apresentaram pequeno número de indivíduos com complicações, como o desenvolvimento de piometra posterior ao procedimento (CHRISTENSEN et al. 2012; MIR et al., 2013).

No estudo de De Bosschere et al. (2001), das 42 cadelas com sinais clínicos de piometra, 30 apresentaram sinais de inflamação uterina no exame histológico e somente quatro foram classificadas como endometrite. As características histológicas encontradas foram: leve infiltração de células inflamatórias no endométrio, glândulas endometriais ocupando 15% da área do endométrio, formando poucos cistos grandes ou diversos pequenos cistos. Uma discreta proliferação de fibroblastos e edema também foram observados.

A quantificação e qualificação de células inflamatórias pode ser realizada no endométrio para a diferenciação entre os tipos de endometrite (aguda, sub-aguda ou crônica) (SEGABINAZZI et al., 2017; TUMMARUK et al., 2010). Em um estudo realizado em porcas, determinou-se que na endometrite aguda há elevado número de neutrófilos nas camadas do tecido subepitelial (> 100 células); na endometrite subaguda, há neutrófilos (com 40 a 100 células), com presença de um certo número de plasmócitos (> 10 células); e, na endometrite crônica, há grande número de linfócitos nas camadas subepiteliais (> 40 células), presença de plasmócitos nas camadas do tecido subepitelial (> 10 células) e um número relativamente baixo de neutrófilos (<20 células) (TUMMARUK et al., 2010). Esses números expressam a soma da contagem realizada em 20 campos de cada corte uterino, no aumento de 400X.

Não foram encontrados estudos baseados na imunomarcagem de COX-2 no útero de cadelas com endometrite. Em porcas, a avaliação imunohistoquímica do endométrio revelou imunomarcagem de COX-2 apenas no citoplasma das células do epitélio luminal; as que possuíam endometrite aguda apresentaram maior porcentagem de área imunomarcada e intensidade de marcação quando comparadas com as que possuíam endometrite crônica e as com endométrio normal, sem influência do estágio do ciclo estral e histórico de acasalamento (ROONGSITTHICHAJ et al, 2011).

### 2.3.2 Complexo hiperplasia endometrial cística - piometra

O complexo hiperplasia endometrial cística (HEC) – piometra é uma das afecções mais comuns na rotina clínica de pequenos animais e, embora possa se manifestar em qualquer idade, 66% das fêmeas acometidas têm idade acima de 9 anos. As nulíparas apresentam maior risco em relação às primíparas e múltiparas (NISKANEM; THRUSFIELD, 1998). É uma alteração hormonalmente mediada e, devido a essa característica, normalmente é observada no diestro. A contaminação bacteriana no útero pode resultar em bacteremia/ toxemia potencialmente fatal (SCHWEIGERT et al., 2009). A patogênese dessa síndrome envolve uma sequência de acontecimentos que se iniciam com a hiperplasia endometrial, com ou sem cistos, que faz com que as secreções se acumulem, seguido de infecção bacteriana endometrial e exsudato em lúmen uterino (SCHLAFER; GIFFORD, 2008).

O diagnóstico dessa afecção é realizado primeiramente baseado no histórico, onde pode ser relatado hipo ou anorexia, apatia, poliúria/polidipsia, secreção vaginal anormal, vômito e diarreia; e, em alterações presentes no exame físico, como hipertermia ou hipotermia, dor à palpação abdominal, congestão de mucosas, tempo de preenchimento capilar alterado, entre outros sinais de inflamação/infecção sistêmica (HAGMAN; KINDAHL; LAGERSTEDT, 2006). Exames complementares como hemograma completo, perfil bioquímico sérico e ultrassonografia abdominal são realizados para confirmação do diagnóstico clínico (BIGLIARDI et al., 2004; SANT'ANNA et al., 2014).

Na histologia, existem algumas classificações para essa síndrome, as quais são baseadas em sinais de inflamação, grau de alteração e formação cística de glandulas endometriais, arquitetura do endométrio, presença de fibrose e integridade de epitélio luminal (DE BOSSCHERE et al., 2001; DOW, 1959). Dow (1959) estabeleceu, baseado nesses parâmetros, quatro grupos distintos:

- Tipo I, com animais em diferentes estágios do ciclo estral apresentando hiperplasia cística sem infiltração inflamatória do estroma endometrial;
- Tipo II, com animais no diestro/ final de diestro apresentando alterações como infiltração de plasmócitos difusas sobreposta à hiperplasia glandular cística do endométrio;
- Tipo III, com animais no diestro apresentando infiltração

polimorfonuclear de intensidade variável sobreposta em endométrio cístico;

- Tipo IV, com animais no final do diestro/ início de anestro apresentando endometrite crônica, muitas vezes com metaplasia escamosa do epitélio, com ou sem dilatação do lúmen uterino.

De Bosschere et al. (2001), por sua vez, realizaram a divisão das alterações se baseando nos achados histológicos em seis grupos (Normal, HEC moderada, HEC severa, mucometra, endometrite, piometra hiperplásica e piometra atrófica), ressaltando principalmente a importância de diferenciar as alterações císticas e secretórias das inflamatórias e infecciosas. Nenhuma das cadelas saudáveis avaliadas apresentou sinais de inflamação na histologia, embora 77% (20/26) tenha apresentado algum grau de hiperplasia endometrial cística, sendo que em 45% (9/20) essa hiperplasia era severa (DE BOSSCHERE et al., 2001).

Em relação a presença e extensão do infiltrado inflamatório no endométrio vs. agente infeccioso encontrado, foi observado que não houve diferença entre piometras causadas pela *E. coli* e outras bactérias, e que o fator determinante para a intensidade do infiltrado inflamatório uterino estava na correlação direta com o número de colônias de microrganismos (unidades/mL) (COGGAN et al., 2008).

Com a intenção de avaliar a resposta inflamatória no endométrio de cadelas com piometra, foram realizados estudos da expressão gênica e na imunomarcagem da COX-2 no útero (SILVA et al., 2009; VEIGA et al., 2016; VOLPATO, 2015; VOORWALD et al., 2015). A transcrição de gene COX-2 é maior no endométrio de cadelas com piometra do que cadelas saudáveis na fase do diestro e anestro (SILVA et al., 2009; VOORWALD et al., 2015). Na imunomarcagem de COX-2 no endométrio canino foi observado em cadelas com piometra maior intensidade de marcação citoplasmática nas células do epitélio luminal e células do estroma endometrial (inflamatórias) em comparação com cadelas com HEC e/ou mucometra e cadelas sem alterações histológicas (VEIGA et al., 2016). Entretanto, ao serem avaliados fragmentos de cérvix para imunomarcagem de COX-2 em endométrio e miométrio, não foram observadas diferenças na intensidade e distribuição das marcações citoplasmáticas entre cadelas saudáveis em fase folicular e lútea e cadelas com piometra (VOLPATO, 2015).

Dentre as alterações hiperplásicas endometriais uterinas existe ainda uma subclassificação, denominada hiperplasia do endométrio pseudo

placentacional (SCHLAFER; GIFFORD, 2008). Essa alteração também é conhecida como decíduoma, hiperplasia endometrial na pseudociese e hiperplasia endometrial placentária materna (KOGUCHI et al., 1995; NOMURA, 1997). Ao contrário do observado na HEC clássica, o endométrio nesta forma de hiperplasia endometrial responde a estímulos com uma remodelação proliferativa altamente organizada que é muito semelhante à histologia normal do endométrio em locais de placentação em gravidez normal (SCHLAFER; GIFFORD, 2008). Assim como a HEC, ocorre principalmente durante a fase lútea do ciclo, quando o endométrio está altamente sensível, podendo ser induzido por inúmeros fatores externos (NOMURA, 1997).

Histologicamente, essa alteração é descrita como uma intensa proliferação do endométrio, que se divide em camadas distintas. O lúmen uterino é revestido por longas pregas de vilosidades que se estendem a partir da superfície endometrial e contém acumulações de secreções endometriais. A camada mais densa do meio é coberta por dobras de células epiteliais hiperplásicas e hipertróficas que cobrem uma faixa mais densa de tecido conjuntivo. Por fim, observa-se a camada do endométrio mais próxima ao miométrio, que contém muitas glândulas endometriais uniformemente dilatadas (KOGUCHI et al., 1995; SCHLAFER; GIFFORD, 2008). Observa-se, na superfície cística, que as células epiteliais estão vacuolizadas em sua região basal, com núcleo esférico apicalmente posicionado e um elevado número de microvilosidades curtas (BARTEL; SCHÖNKYPL; WALTER, 2010). Essas alterações são semelhantes às células epiteliais das câmaras glandulares da placenta canina (GRETHER; FRIESS; STOFFEL, 1998).

### 2.3.3 Adenomiose

A adenomiose é definida pela presença de tecido endometrial ectopicamente dentro das camadas miometriais da parede uterina (SCHLAFER; GIFFORD, 2008). Essa alteração é amplamente estudada em humanos, devido aos sinais clínicos que pode causar (hemorragia) e por seu difícil diagnóstico e tratamento (PERIC; FRASER, 2006; STRUBLE; REID; BEDAIWY, 2016). Há evidências que a alteração tem causa genética (ARNOLD; MECK; SIMON, 1995). Não houve associação com infecções na espécie canina (FRANSSON et al., 1997).

Em cadelas, essa alteração tende a ser um achado histológico, com raros relatos de complicações (SANTOS et al., 2008; STÖCKUN-GAUTSCHI et al.,

2001). Normalmente, é relatada em associação a outras afecções uterinas, como hiperplasia endometrial cística e piometra (DOW, 1959; SANTOS et al., 2008; MIR et al., 2013). Em alguns casos, à medida que as secreções glandulares se acumulam e a pressão aumenta, o revestimento pode sofrer atrofia e, em alguns casos, desaparecer inteiramente, deixando um cisto dentro do miométrio, que é revestido somente pelo tecido conjuntivo (SCHLAFER; GIFFORD, 2008).

#### 2.3.4 Brucelose

A brucelose canina é causada pela *Brucella canis*, um pequeno cocobacilo, Gram negativo, aeróbico, imóvel, não esporulado e não encapsulado, distinguindo-se de outras espécies de *Brucella* por apresentar colônias com morfologia rugosa e aspecto mucoide, com características bioquímicas próprias (SPINK; MORISSET, 1970).

A transmissão envolve o contato direto com o microrganismo. As fêmeas transmitem a doença durante o estro, no momento da cobertura, por via transplacentária e após o abortamento (CARMICHAEL; JOUBERT, 1988). Os aerossóis advindos do material abortivo podem ser considerados a principal via de infecção, devido à presença de grande quantidade de microrganismos (BRENNAN et al., 2008). Existe a possibilidade de transmissão pelo sêmen, principalmente durante as primeiras seis a oito semanas de infecção (KEID et al., 2007). A doença tem importância zoonótica e desenvolvimento crônico, o que traz grande preocupação com a contaminação do ambiente (MARZETTI et al., 2013; REYNES et al., 2012).

A presença do agente no organismo causa, principalmente, alterações reprodutivas, como infertilidade, abortamentos, geralmente no terço final da gestação e a ocorrência de natimortos (ARAS; UÇAN, 2010; BRENNAN et al., 2008; MEGID et al., 2008). A suspeita clínica, baseada no histórico reprodutivo e sinais clínicos, deve ser confirmada por exames laboratoriais, como o teste de ELISA, PCR de gânglios linfáticos, imunodifusão em gel de ágar, soroaaglutinação rápida e cultura de material biológico (ARAS; UÇAN, 2010; KEID et al., 2009; MORAES et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011).

Alguns medicamentos podem ser utilizados para minimizar os sinais clínicos da doença e, quanto mais tardia a doença for diagnosticada, mais difícil será o tratamento. Apesar de ser possível controlar a eliminação da bactéria via

secreções do parto e a contaminação dos filhotes, a possibilidade de êxito com o tratamento é incerta e os animais se tornam uma fonte de infecção, sendo aconselhada a retirada dos reprodutores contaminados do canil (WANKE , 2004; WANKE et al., 2006).

Para prevenção e controle dessa doença, deve-se testar todo o lote reprodutor para *Brucella*, antes de empreender um programa de acasalamento e, teoricamente, antes de cada acasalamento nas fêmeas e uma ou duas vezes por ano nos machos. Os animais positivos devem ser esterilizados e eliminados de canis de reprodução (MAKLOSKI, 2011; REYNES et al., 2012).

### 2.3.5 Herpesvirose

Há uma crescente preocupação em relação aos problemas causados pelo herpesvírus canino e sua capacidade de se manter latente, principalmente quando se pensa em reprodutores.

O herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1) causa, em neonatos, um quadro de hemorragia multisistêmica e necrose parenquimal (OLIVEIRA et al., 2009). A transmissão em filhotes ocorre via transplacentária, durante o parto, ou pelas secreções maternas oronasais (ROOTWELT et al., 2011). Em cães adultos, o CaHV-1 ocasiona balanopostite em machos (LOPATE, 2012) e pode provocar infertilidade, abortamento, natimortalidade e vulvovaginite em fêmeas (SMITH 1997; VERSTEGEN et al., 2008).

O diagnóstico é baseado na suspeita clínica e em achados de necropsia, nos casos de morte neonatal, sendo confirmado com a detecção do microrganismo por PCR (LARSEN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2009). Como o adulto muitas vezes se apresenta assintomático, o diagnóstico acaba ocorrendo em estudos de prevalência (KROGENÆS et al., 2014; READING; FIELD, 1998).

O estado de latência viral é uma importante característica epidemiológica presente no CaHV-1, já que a porcentagem de animais soropositivos na população canina é alta (MIYOSHI et al., 1999; KROGENÆS et al., 2014). A infecção pode ser reativada em casos de queda de imunidade, provocados por estresse, gestação, doenças prévias ou pela administração de corticosteroides (STRÖM HOLST et al., 2012). Não há tratamentos descritos para a infecção, sendo a vacinação o melhor método de prevenção (DECARO et al., 2008).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas relacionadas a problemas reprodutivos na espécie canina são imprescindíveis para o completo entendimento dos mecanismos envolvidos nos casos de sub e infertilidade. O estudo das alterações que ocorrem a nível microscópico no útero das cadelas com afecções uterinas, principalmente na camada endometrial se faz fundamental para obtenção de métodos diagnósticos eficazes e que possam ser reproduzidos, assim como o conhecimento de fatores que possam contribuir para a propagação e manutenção de agentes infectocontagiosos que também trazem prejuízo para a saúde reprodutiva dessa espécie.

## REFERÊNCIAS

- ABINPET. Setor pet chega a R\$ 18 bilhões em 2015, mas não sem os efeitos da crise Disponível em: <http://abinpet.org.br/site/shhttp://abinpet.org.br/site/setor-pet-chega-a-r-18-bilhoes-em-2015-mas-nao-sem-os-efeitos-da-crise/etor-pet-chega-a-r-18-bilhoes-em-2015-mas-nao-sem-os-efeitos-da-crise/>. Acessado em: 20 set. 2016.
- AGUIRRA, L. R. V. M. **Alterações anatomopatológicas ovarianas e uterinas de cadelas e gatas domiciliadas na região metropolitana de Belém, Pará**. 2013. 129 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém. 2013.
- AL-BASSAM, M. A.; THOMSON, R. G.; O'DONNELL, L. Normal postpartum involution of the uterus in the dog. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 45, n. 3, p. 217, 1981.
- ALGHAMDI, A.; TROEDSSON, M. H. T.; LASCHKEWITSCH, T.; XUE, J. L. Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 55, n. 4, p. 1019-1028, 2001.
- ARAS, Z; UÇAN, U S. Detection of Brucella canis from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR. **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 74, n. 4, p. 658-662, 2010.
- ARNOLD, L. L.; MECK, J. M.; SIMON, J. A. Adenomyosis: evidence for genetic cause. **American Journal of Medical Genetics Part A**, Hoboken, v. 55, n. 4, p. 505-506, 1995.

AYDIN, M.; DOĞAN, H.; TIMURKAAN, S. Changes in the histomorphology of the canine cervix, ovary and steroid hormone levels through the oestrous cycle.

**Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences**, v. 3, n. 10, 2013.

BARRAU, M. D.; ABEL, J. H.; VERHAGE, H. G.; TIETZ, W. J. Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 142, n. 1, p. 47-65, 1975.

BARTEL, C.; SCHÖNKYPL, S.; WALTER, I. Pseudo-placentational Endometrial Cysts in a Bitch. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlim, v. 39, n. 1, p. 74-80, 2010.

BARTEL, C.; TICHY, A.; WALTER, I. Characterization of foamy epithelial surface cells in the canine endometrium. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlim, v. 43, n. 3, p. 165-181, 2014.

BEACH, F. A.; DUNBAR, I. F.; BUEHLER, M. G. Sexual characteristics of female dogs during successive phases of the ovarian cycle. **Hormones and Behavior**, New York, v. 16, n. 4, p. 414-442, 1982.

BIGLIARDI, E.; PARMIGIANI, E.; CAVIRANI, S.; LUPPI, A.; BONATI, L. AND CORRADI, A. Ultrasonography and Cystic Hyperplasia–Pyometra Complex in the Bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlim, v 39, pp 136–140, 2004.

BOUCHARD, G.; YOUNGQUIST, R. S.; VAILLANCOURT, D.; KRAUSE, G. F.; GUAY, P.; PARADIS, M. Seasonality and variability of the interestrous interval in the bitch. **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 36, n. 1, p. 41-50, 1991.

BRENNAN, S. J.; NGELEKA, M.; PHILIBERT, H. M.; FORBES, L. B.; ALLEN, A. L. Canine brucellosis in a Saskatchewan kennel. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 49, n. 7, p. 703, 2008.

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. **The Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 78, n. 1, p. 63-73, 1988.

CHATDARONG, K.; TUMMARUK, P.; SIRIVAIDYAPONG, S.; RAKSIL, S. Seasonal and breed effects on reproductive parameters in bitches in the tropics: a retrospective study. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 48, n. 8, p. 444-448, 2007.

CHRISTIE, D. W.; BELL, E. T. Some observations on the seasonal incidence and frequency of oestrus in breeding bitches in Britain. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 159-167, 1971.

CHRISTENSEN, B. W.; SCHLAFER, D. H.; AGNEW, D. W.; WANG, C.; KOZLOWSKI, C.; ASA, C. S. Diagnostic value of transcervical endometrial biopsies in domestic dogs compared with full-thickness uterine sections. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s6, p. 342-346, 2012.

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

CONCANNON, P. W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, n. 3, p. 200-210, 2011.

CONCANNON, P. W.; HANSEL, W.; VISEK, W. J. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 13, n. 1, p. 112-121, 1975.

DAVIDSON, A. Current concepts on infertility in the bitch. **Waltham Focus**, London, v. 16, n. 2, p. 13 – 21, 2006.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; VAN DEN BROECK, W.; CORYN, M. Cystic endometrial hyperplasia-piometra complex in the bitch: Should the two entities disconnected? **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 55, n. 7, p. 1509–1519. 2001.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Canine adenoviruses and herpesvirus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 799-814, 2008.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 69, p. 237IN17-250IN18, 1959.

ENGLAND, G. C. W.; RUSSO, M.; FREEMAN, S. L. Follicular dynamics, ovulation and conception rates in bitches. **Reproduction in Domestic Animals**, London, v. 44, n. s2, p. 53-58, 2009.

ENGLAND, G.C.W.; RUSSO, M.; FREEMAN, S.L. The bitch uterine response to semen deposition and its modification by male accessory gland secretions. **The Veterinary Journal**, London, v. 195, p.179–184, 2013.

FONTAINE, E.; LEVY, X.; GRELLET, A.; LUC, A.; BERNEX, F.; BOULOUIS, H. J.; FONTBONNE, A. Diagnosis of endometritis in the bitch: a new approach. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, n. 2, p. 196-199, Jul. 2009.

FONTBONNE, A. Infertility in bitches and queens: recent advances. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.202-209, 2011.

FRANSSON, B.; LAGERSTEDT, A. S.; HELLMEN, E.; JONSSON, P. Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine diseases. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 44, n. 1-10, p. 417-426, 1997.

FREEMAN, S.L.; GREEN, M. J.; ENGLAND, G. C. W. Uterine fluid from bitches with mating-induced endometritis reduces the attachment of spermatozoa to the uterine epithelium. **The Veterinary Journal**, London, v. 198, n. 1, p. 76-80, 2013.

GALABOVA, G.; EGERBACHER, M.; AURICH, J. E.; LEITNER, M.; WALTER, I. Morphological changes of the endometrial epithelium in the bitch during metoestrus and anoestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, London, v. 38, n. 5, p. 415-420, 2003.

GIFFORD, A. T.; SCARLETT, J. M.; SCHLAFER, D. H. Histopathologic findings in uterine biopsy samples from subfertile bitches: 399 cases (1990–2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 2, p. 180-186, 2014.

GILBERT, R. O.; SHIN, S. T.; GUARD, C. L.; ERB, H. N.; FRAJBLAT, M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows Original Research Article. **Theriogenology**, Los Altos, California, v. 64, n. 9, pp 1879-1888, 2005.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, Los Altos, California, v. 70, n. 3, p. 270-285, 2008.

GREYER, B. M.; FRIESS, A. E.; STOFFEL, M. H. The glandular chambers of the placenta of the bitch in the second third of pregnancy (day 30–44): an ultrastructural, ultrahistochemical and lectin histochemical investigation. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 27, n. 2, p. 95-103, 1998.

GROPETTI, D.; ARALLA, M.; BRONZO, V.; BOSI, G.; PECILE, A.; ARRIGHI, S. Periovulatory time in the bitch: what's new to know?: Comparison between ovarian histology and clinical features. **Animal Reproduction Science**, v. 152, p. 108-116, 2015.

GRUNDY, S. A.; FELDMAN, E.; DAVIDSON, A. Evaluation of Infertility in the Bitch. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v 17, n 3, pp 108-115, 2002.

HAGMAN, R.; KINDAHL, H.; LAGERSTEDT, A.-S. Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F<sub>2α</sub> metabolite levels. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 47, n. 1, p. 55, 2006.

HEAPE, W. The "sexual season" of mammals and the relation of the "pro-oestrus" to menstruation. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 44, p. 1-70, 1900.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2—10 years later. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 2, p. 367-375, 2002.

HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 275-288, 1996.

HOLST, P. A.; PHEMISTER, R. D. The prenatal development of the dog: preimplantation events. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 5, n. 2, p. 194-206, 1971.

JÖCHLE, W.; ANDERSEN, A. C. The estrous cycle in the dog: a review. **Theriogenology**, Los Altos, California, v. 7, n. 3, p. 113-140, 1977.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Clinical approach to infertility in the bitch. In: \_\_\_\_\_. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: Saunders, 2001. p. 257-273.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. The canine estrous cycle. In: \_\_\_\_\_. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: Saunders, 2001. p. 16-31.

KACHHWAHA, S.; TANWAR, R. K.; GAUR, M. Prevalence of reproductive pathology in stray bitches in and around Jodhpur. **Veterinary Practitioner**, v. 11, n. 2, p. 154-155, 2010.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 86, n. 1, p. 22-26, 2009.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CHIEBAO, D. P.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; RICHTZENHAIN, L. J. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. **Theriogenology**, Los Altos, California, v. 67, n. 7, p. 1203-1210, 2007.

KITAYA, K.; YASUO, T.; TADA, Y.; HAYASHI, T.; TAGUCHI, S.; FUNABIKI, M.; NAKAMURA, Y. Current understanding of chronic endometritis. **Diagnostic Histopathology**, v. 19, n. 7, p. 231-237, 2013.

KOGUCHI, A.; NOMURA, K.; FUJIWARA, T.; KAWAI, Y.; OKANIWA, A. Maternal placenta-like endometrial hyperplasia in a beagle dog (Canine deciduoma). **Experimental Animals**, v. 44, n. 3, p. 251-253, 1995.

KROGENÆS, A.; ROOTWELT, V.; LARSEN, S.; RENSTRÖM, L.; FARSTAD, W.; LUND, A. A serological study of canine herpesvirus-1 infection in a population of breeding bitches in Norway. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 56, n. 1, p. 1, 2014.

KUSTRITZ, M. V. R. Managing the reproductive cycle in the bitch. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 42, n. 3, p. 423-437, 2012.

LARSEN, R. W.; KIUPEL, M.; BALZER, H. J.; AGERHOLM, J. S. Prevalence of canine herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 57, n. 1, p. 1, 2015.

LINDE, C. Partial abortion associated with genital *Escherichia coli* infection in a bitch. **The Veterinary Record**, v. 112, n. 19, p. 454-455, 1983.

LINDE-FORSBERG, C.; WALLEN, A. Effects of whelping and season of the year on the interoestrous intervals in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 67-70, 1992.

LOPATE, C. The problem stud dog. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 42, n. 3, p. 469-488, 2012.

LUZ, M. R.; BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; LOPES, M. D. In vitro PGF2 $\alpha$  production by endometrium and corpus luteum explants from pregnant and nonpregnant diestrus bitches and placental explants from pregnant bitches. **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 66, n. 6, p. 1442-1447, 2006.

MAKLOSKI, C. L. Canine brucellosis management. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 41, n. 6, p. 1209-1219, 2011.

MARSHALL, F. H. A; JOLLY, W. A. Contributions to the physiology of mammalian reproduction. Part I. The oestrous cycle in the dog. Part II. The ovary as an organ of internal secretion. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character**, p. 99-141, 1906.

MARZETTI, S.; CARRANZA, C.; RONCALLO, M.; ESCOBAR, G. I.; LUCERO, N. E. Recent trends in human *Brucella canis* infection. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Exeter, v. 36, n. 1, p. 55-61, 2013.

MASSENSO, A. P. B. **Avaliação da fibrose endometrial e dos miofibroblastos nas endometroses ativa e inativa da éguas**. 2012. 93p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu. 2012.

MEGID, J.; SALGADO, V.R.; KEID, L.B.; SIQUEIRA, A.K.; CRUZ, T.F.; GRINSPAN, J.; LISTONI, F.J.P.; PAES, A.C. Abortamento canino por *Brucella canis*: relato de caso. **Veterinaria e Zootecnia**, Botucatu, v.15, n.3, p.445-448, 2008.

MELO, L. Como o brasileiro cuida e quanto gasta com seus pets. Disponível em: <https://exame.abril.com.br/negocios/como-o-brasileiro-cuida-e-quanto-gasta-com-seus-pets/>. Acessado em: 20 set. 2016.

MEYERS-WALLEN, V. N. Gonadal and sex differentiation abnormalities of dogs and cats. **Sexual Development**, v. 6, n. 1-3, p. 46-60, 2012.

MIR, F.; FONTAINE, E.; ALBARIC, O.; GREER, M.; VANNIER, F.; SCHLAFER, D. H.; FONTBONNE, A. Findings in uterine biopsies obtained by laparotomy from bitches with unexplained infertility or pregnancy loss: An observational study. **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 79, n. 2, p. 312-322, 2013.

MIYOSHI, M.; ISHII, Y.; TAKIGUCHI, M.; TAKADA, A.; YASUDA, J.; HASHIMOTO, A.; KIDA, H. Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v. 61, n. 4, p. 375-379, 1999.

MORAES, C. C. G. D.; MEGID, J.; SOUZA, L. C. D.; MENESES, A. M. C.; CROCCI, A. J.; SANTOS, R. B. Imunodifusão em gel de agar e soroaglutinação rápida para a detecção de anticorpos Anti-" *Brucella canis*". **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 1, p.34-43, 2009.

NISKANEM, M.; THRUSFIELD, M. V. Association between age, parity, hormonal therapy and breed and pyometra in finnish dogs. **The Veterinary Records**, London, v. 143, n. 18, p. 493- 498, 1998.

NOMURA, K. Induction of canine deciduoma in some reproductive stages with the different conditions of corpora lutea. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 3, p. 185-190, 1997.

O'CONNOR, C. L.; SCHWEIZER, C.; GRADIL, C.; SCHLAFER, D.; LOPATE, C.; PROCIUK, U.; MEYERS-WALLEN, V. N.; CASAL, M. L. Trisomy-X with estrous cycle anomalies in two female dogs. **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v 76, pp 374–380, 2011.

OKKENS, A. C.; BEVERS, M. M.; DIELEMANB, S. J.; VAN HAAFTEN, B.; VAN SLUIJS, F. J. Fertility problems in the bitch. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 28, p. 379-387, 1992.

OLIVEIRA, E. C.; SONNE, L.; BEZERRA JÚNIOR, P. S.; TEIXEIRA, E. M.; DEZENGRINI, R.; PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D. Achados clínicos e patológicos em cães infectados naturalmente por herpesvírus canino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 8, p. 637-642, 2009.

OLIVEIRA, M. Z. D.; VALE, V.; KEID, L.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; PORTELA, R. W.; BARROUIN-MELO, S. M. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. **Research in Veterinary Science**, London, v. 90, n. 3, p. 425-431, 2011.

OLSON, P. N.; BOWEN, R. A.; BEHRENDT, M. D.; OLSON, J. D.; NETT, T. M. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 27, n. 5, p. 1196-1206, 1982.

ORTEGA-PACHECO, A.; Segura-Correa, J. C.; Jimenez-Coello, M.; Forsberg, C. L. Reproductive patterns and reproductive pathologies of stray bitches in the tropics. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 382-390, 2007.

PATNAIK, A. K.; GREENLEE, P. G. Canine ovarian neoplasms: a clinicopathologic study of 71 cases, including histology of 12 granulosa cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 24, n. 6, p. 509-514, 1987.

PERIC, H.; FRASER, I. S. The symptomatology of adenomyosis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 20, n. 4, p. 547-555, 2006.

PEREIRA, P. D.; LOPES, C. C.; MATOS, A. J. F.; SANTOS, M.; GÄRTNER, F.; MEDEIROS, R.; LOPES, C. COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 140, n. 4, p. 247-253, 2009.

PHEMISTER, R. D.; HOLST, P. A.; SPANO, J. S.; LLOYD HOPWOOD, M. Time of ovulation in the beagle bitch. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 8, n. 1, p. 74-82, 1973.

PIRES, M. A.; PAYAN-CARREIRA, R. Resident Macrophages and Lymphocytes in the Canine Endometrium. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlim, v. 50, n. 5, p. 740-749, 2015.

PREVIATO, P. F. G.; NETO, A. P.; WERNER, P. R.; ACCO, A.; MOTA, M. F.; DA SILVA, A. V.; DA FONSECA, J. F. Alterações morfológicas nos órgãos genitais de cães e gatos provenientes de Vilas Rurais da região de Umuarama, PR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 8, n. 2, p. 105-110, 2005.

READING, M. J.; FIELD, H. J. A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population. **Archives of Virology**, Vienna, v. 143, n. 8, p. 1477-1488, 1998.

REDDY, K. C. S.; RAJU, K. G. S.; RAO, K. S.; RAO, K. B. R. Vaginal cytology, vaginoscopy and progesterone profile: breeding tools in bitches. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 25, n. 2, p. 51-54, 2011.

REHM, S.; STANISLAUS, D. J.; WILLIAMS, A. M. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 3, p. 233-245, 2007.

REYNES, E.; LÓPEZ, G.; AYALA, S. M.; HUNTER, G. C.; LUCERO, N. E. Monitoring infected dogs after a canine brucellosis outbreak. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 533-537, 2012.

RIBEIRO, A.; VICENTE, W.; APPARICIO, M.; GADELHA, C.; ALVES, A.; COVIZZI, G. Uterine leucocyte infiltration after artificial insemination in bitches. **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 66, p. 1462 – 1464, 2006.

ROOTWELT, V.; LUND, A.; KROGENÆS, A. Herpes virus infection in the dog—a review. **The European Journal of Companion Animal Practice**, Paris, v. 21, p. 31, 2011.

ROONGSITTHICHAI, A.; SRISUWATANASAGUL, S.; KOONJAENAK, S.; TUMMARUK, P. Expression of cyclooxygenase-2 in the endometrium of gilts with different stages of endometritis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 11, p. 1425-1431, 2011.

SANT'ANNA, M. C.; GIORDANO, L. G. P.; FLAIBAN, K. K. M. C.; MULLER, E. E.; MARTINS, M. I. M. Prognostic markers of canine pyometra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1711-1717, 2014.

SANTOS, I. B.; MIRANDA, L. H. M.; PIZZOLATO, F.; OKAMOTO, T.; TORTELLY, R. Adenomyose focal e difusa em cadelas. **Revista de Ciências da Vida**, v. 28, n. 1, p. 79-83, 2009.

SATO, Y. Pseudo-placentational endometrial hyperplasia in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 5, p. 1071-1074, 2011.

SCHWEIGERT, A.; SILVA, A. A.; ORLANDI, C. M. B.; RODIGHERI, S. M. Complexo hiperplasia endometrial cística (piometra) em cadelas--diagnóstico e terapêutica. **Colloquium Agrariae**, Presidente prudente, v. 5, n.1, p. 32 – 37, 2009.

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

SEGABINAZZI, L. G. FRISO, A. M., CORREAL, S. B., CRESPILO, A. M., DELL'AQUA JR, J. A., MIRÓ, J., ALVARENGA, M. A. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 104, p. 120-126, 2017.

SILVA, E.; LEITÃO, S.; FERREIRA-DIAS, G.; LOPES DA COSTA, L.; MATEUS, L. Prostaglandin synthesis genes are differentially transcribed in normal and pyometra endometria of bitches. **Reproduction in Domestic Animals**, London v. 44, n. s2, p. 200-203, 2009.

SMITH, K. C. Herpesviral abortion in domestic animals. **The Veterinary Journal**, London, v. 153, n. 3, p. 253-268, 1997.

SOKOLOWSKI, J. H.; ZIMBELMAN, R. G.; GOYINGS, L. S. Canine reproduction: reproductive organs and related structures of the nonparous, parous, and postpartum bitch. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 8, p. 1001, 1973.

SPINK, W. W.; MORISSET, R. Epidemic canine brucellosis due to a new species: *Brucella canis*. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, Baltimore, v. 81, p. 43, 1970.

STÖCKUN-GAUTSCHI, N. M.; GUSCETTI, F.; REICHLER, I. M.; GEISSBÜHLER, U.; BRAUN, S. A.; ARNOLD, S. Identification of focal adenomyosis as a uterine lesion in two dogs. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 42, n. 8, p. 413-416, 2001.

STRÖM HOLST, B.; HAGBERG GUSTAVSSON, M.; GRAPPERON-MATHIS, M.; LILLIEHÖÖK, I.; JOHANNISSON, A.; ISAKSSON, M.; AXNÉR, E. Canine Herpesvirus During Pregnancy and Non-Pregnant Luteal Phase. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlim, v. 47, n. s6, p. 362-365, 2012.

STRUBLE, J.; REID, S.; BEDAIWY, M. A. Adenomyosis: a clinical review of a challenging gynecologic condition. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, v. 23, n. 2, p. 164-185, 2016.

TAVASOLI, A.; SOLATI, A. Granulosa cell tumor of the ovary in dog: Case report from Tehran. **Journal of Cell and Animal Biology**, v. 5, n. 4, p. 66-68, 2011.

TUMMARUK, P.; KESDANGSAKONWUT, S.; PRAPASARAKUL, N.; KAEOKET, K. Endometritis in gilts: reproductive data, bacterial culture, histopathology, and infiltration of immune cells in the endometrium. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 6, p. 575-584, 2010.

VEIGA, G. A. L.; MIZIARA, R. H.; ANGRIMANI, D. S. R.; PAPA, P. C.; COGLIATI, B.; VANNUCCHI, C. I. Cystic endometrial hyperplasia–pyometra syndrome in bitches: identification of hemodynamic, inflammatory, and cell proliferation changes. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 1, p. 58-69, 2017.

VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERSTEGEN-ONCLIN, K. Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review. **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v 70, pp 304–319, 2008.

VOLPATO, R. **Avaliação imunoistoquímica da cérvix de cadelas saudáveis e com o diagnóstico de piometra**. 2015. 149p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2015.

VOORWALD, F. A.; MARCHI, F. A.; VILLACIS, R. A. R.; ALVES, C. E. F.; TONIOLO, G. H.; AMORIM, R. L.; DRIGO, S. A.; ROGATTO, S. R. Molecular expression profile reveals potential biomarkers and therapeutic targets in canine endometrial lesions. **PloS One**, São Francisco, v. 10, n. 7, p. e0133894, 2015.

WANKE, M. M.; DELPINO, M. V.; BALDI, P. C. Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial). **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 66, n. 6, p. 1573-1578, 2006.

WATTS, J. R.; WRIGHT, P. J. Investigating uterine disease in the bitch: uterine cannulation for cytology, microbiology and hysteroscopy. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 201-206, 1995.

WILDT, E.; SEAGER, S. W. J.; CHAKRABORTY, P. K. Behavioral, ovarian and endocrine relationships in the pubertal bitch. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 53, n. 1, p. 182-191, 1981.

ZOLGHADRI, J.; MOMTAHAN, M., AMINIAN, K., GHAFFARPASAND, F., & TAVANA, Z. The value of hysteroscopy in diagnosis of chronic endometritis in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 155, n. 2, p. 217-220, 2011.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar diferentes estratégias para a identificação e padronização de alterações uterinas em cadelas, assim como estabelecer fatores de risco para infecção por herpesvírus e *Brucella canis*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar determinados fatores de risco obtidos no histórico geral e reprodutivo de cadelas submetidas a castração eletiva com o diagnóstico de herpesvírus canino e *Brucella canis*

- Estabelecer relação entre as alterações uterinas de cadelas diagnosticadas na histomorfologia, nas mensurações morfométricas da parede uterina e na contagem de células inflamatórias endometriais e a imunomarcção para ciclooxigenase 2 (COX-2) em endométrio

- Estabelecer padrão de infiltrado de células inflamatórias endometriais e de imunomarcção para COX-2 em endométrio de cadelas híidas em diferentes fases do ciclo estral

**4 ARTIGO A****CANINE HERPESVIRUS TYPE I AND *Brucella canis* SURVEY AND RISK  
FACTORS STUDY IN PREPUBERTAL AND PUBERTAL BITCHES SUBMITTED  
TO ELECTIVE OVARIOHYSTERECTOMY**

CANINE HERPESVIRUS TYPE 1 AND *Brucella canis* SURVEY AND RISK FACTORS STUDY IN PREPUBERTAL AND PUBERTAL BITCHES SUBMITTED TO ELECTIVE OVARIOHYSTERECTOMY

Rebeca Cordeiro Justino<sup>1</sup>, Rafael Bernardes<sup>1</sup>, Ana Paula da Silva<sup>2</sup>, Juliana Torres Tomazi Fritzen<sup>2</sup>, Alice Fernandes Alfieri<sup>2</sup>, Lucienne Garcia Pretto Giordano<sup>2</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Clinics, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. <sup>2</sup>Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. imartins@uel.br

ABSTRACT

The presence of infectious agents in bitches may cause reproductive pathologies, and these can trigger subfertility, infertility, miscarriage, abortions and stillbirths. The objective of this work was to investigate the prevalence of canine herpesvirus 1 and *Brucella canis* in bitches submitted to elective ovariohysterectomy (OHE), as well as to investigate risk factors that may be associated with these infections. Female mixed-breed dogs (n=40), between the ages of 5 months and 15 years, in all phases of the estrous cycle were used. Agar gel immunodiffusion test was used for the diagnosis of *Brucella canis*. The diagnosis of canine herpesvirus was performed in two stages. First, a PCR was performed with samples from vaginal and ocular mucosa, followed by a serum neutralization test. For the evaluation of risk factors animal history was used, with information about general health and reproductive history. All data were submitted to the IBM SPSS program for analysis (p<0.05). The antibody screenings for *Brucella canis* and the PCR assays for herpesvirus were negative for all the animals evaluated. The herpesvirus serum neutralization tests were positive for 68.4% (26/38; titers ranging from 2 to 32). No association was found among the variables analyzed in this study as risk factors to serum neutralization positivity. Under the conditions in which the present work was developed, there seems to be no association between risk factors and the agents studied.

Keywords: Bitches, uterus, subfertility, brucellosis, canine herpesvirus

## 1. INTRODUCTION

It is known that bacterial and viral agents can cause reproductive problems, and *Brucella canis* and herpesvirus stand out due to their peculiar characteristics (PRETZER, 2008; VERSTEGEN et al., 2008). The difficult treatment and uncertain cure, as well as the zoonotic nature of brucellosis increases the potential consequences of this infection, especially for children and immunocompromised individuals (AZEVEDO et al., 2003; MARZETTI et al., 2013; WANKE et al., 2006). In addition, there is an increasing concern about the reproductive problems caused by canine herpesvirus 1 (CaHV-1) and its ability to remain latent, especially in animals from breeding kennels and agglomeration sites such as shelters and adoption fairs (VERSTEGEN et al., 2008).

Brucellosis transmission involves direct contact with the microorganism. Females transmit the disease during estrus, at the time of copulation, transplacentally and abortion remains (CARMICHAEL; JOUBERT, 1988). Aerosols from the aborted material are the main route of infection due to the large bacterial load (BRENNAN et al., 2008). Brucellosis has a zoonotic potential and is a chronic disease, which creates substantial concerns about human infection and contamination of the environment (MARZETTI et al., 2013; REYNES et al., 2012).

The presence of *Brucella canis* in an animal causes reproductive changes such as infertility, abortions that occur primarily in the final third of gestation, and stillbirths (ARAS; UÇAN, 2010; BRENNAN et al., 2008; MEGID et al., 2008). The diagnosis is based on reproductive history and clinical signs, and confirmed by laboratory tests. ELISA tests, agar gel immunodiffusion tests and rapid serum agglutination tests are appropriate serological tests, and PCR from lymph node samples and blood culture are the most indicated assays for bacterial detection (ARAS; UÇAN, 2010; KEID et al., 2009; MORAES et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011).

In adult dogs, CaHV-1 can cause infertility, miscarriage, stillbirth and vulvovaginitis in females (SANT'ANNA; FABRETTI; MARTINS, 2012; SMITH 1997; VERSTEGEN et al., 2008). In cases of neonatal death, diagnosis is based in the clinical and necropsy findings, and confirmed by detection of viral genome fragments by PCR (LARSEN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2009). Adult animals are often

asymptomatic, thus serological responses are often detected by prevalence studies (KROGENÆS et al., 2014; READING; FIELD, 1998).

Viral latency is an important epidemiological feature of CaHV-1, since the percentage of seropositive animals in the canine population is high (KROGENÆS et al., 2014; READING; FIELD, 1998). The virus can remain latent in ganglia neurons as well as lymph nodes and salivary glands (BURR et al., 1996; MIYOSHI et al., 1999). The infection can be reactivated in cases of immunodeficiencies caused by stress, other diseases or by the administration of corticosteroids (LEDBETTER et al., 2009). When appropriate management is established with pregnant bitches and there are no other causes of stress, gestation does not seem to be a sufficient factor for viral reactivation (STRÖM HOLST et al., 2012).

According to Evermann, Sellon and Sykes (2012), the diffusion and propagation of infectious disease may depend on factors particular to the microorganism, the host and the environment. Previous studies tried to establish some risk factors for *Brucella canis* and CaHV-1, being these factors based mainly on the reproductive history, the hygiene of the environment, free access to street, travels and participation in competitions (AZEVEDO et al., 2013; FERNANDES et al., 2011; KROGENÆS et al., 2014; RONSSE et al., 2004)

Little is known about the distribution and prevalence of *Brucella canis* and canine herpesvirus 1 in Brazil. To improve preventive measures it is essential to know the factors that are related to the dissemination of these pathogens and, therefore, the study of risk factors is so important. The objective of this study was to survey owners of animals that were positive for *Brucella canis* and/or CaHV-1 and to investigate risk factors that may be associated with these infections.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Animals and history

The study was conducted with 40 mixed-breed bitches between the ages of 5 months and 15 years, weighing between 1 and 30 kg. All animals were part of a sterilization program in the central eastern region of Paraná State, Brazil and were previously stray dogs that had been adopted. The project was approved by the institutional ethics committee (CEUA 28647.2013.53).

General information and the reproductive status of the animals were provided by their tutors. Those animals whose information (variables) were unknown were taken from the statistical analysis.

The variables were: age, puberty (observation of the first estrus), mating history (if yes, how many times), history of mating followed or not by gestation, history of abortion, history of abnormal vaginal discharge, history of parturition (if they occurred and how many times).

### 2.3. Diagnosis of *Brucella canis*

Approximately 3 mL of venous blood was collected preoperatively from the jugular vein of all bitches. Serum was obtained by coagulation at room temperature and stored at -20°C until processing.

The agar gel immunodiffusion test (AGID) was performed using the *Brucella ovis* protein kit (TECPAR®, Curitiba, PR, Brazil), which has already been standardized for *Brucella canis* diagnosis (AZEVEDO et al., 2004). The test was prepared and conducted according to the manufacturer's instructions.

### 2.4 Diagnosis of Canine Herpesvirus 1

#### 2.4.1 PCR

Swabs of vaginal and ocular mucosa were collected separately, and the samples were placed in 1 mL of NaCl 0.9%. The swabs were stored at -80°C until processing.

Viral DNA was extracted according to the method described by Boom et al. (1990) modified by Alfieri et al. (2006). For the PCR assay, forward (3'-CCTAAACCTACTTCGGATAG-5') and reverse (3'-GGCTTTAAATGAACTT-CTCTGG-5') primers were used to amplify a fragment of 450 bp of the CHV-1 glycoprotein B gene. The final concentrations of the reagents were as follows: 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 500 mM each of dNTP, 1.25 U of Taq polymerase and 10 pmol of each primer (RONSSE et al., 2005). The extracted material (1 µL) was added to a final volume of 10 µL. The positive control originated from a field sample that was available in the laboratory. Ultra-pure water free of nucleases was used as a negative

control. PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and observed in ultraviolet light.

#### 2.4.2 Serum neutralization

Serum was obtained as previously described for *Brucella canis* diagnosis. Canid alphaherpesvirus 1 strain BTU-1 isolate HVC199/12, was used for the analysis. Serum was previously inactivated by heating at 56°C for 30 min. Thus, 50 µL of sample was placed in 96-well microplates, were diluted in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) twofold starting at 1:2. The virus strain (50 µL) was added, corresponding to 100 TCID<sub>50</sub>. The viral concentration was calculated using the Reed and Muench method (REED; MUENCH, 1938). After incubating at 37°C for 1 h with 5% CO<sub>2</sub>, 50 µL of suspension containing 1X10<sup>5</sup> Madin-Darby Canine Kidney cells/mL was added to each well. Virus, serum and cell controls were included, and cell toxicity was assessed. Plates were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After 3 days, the final reading was carried out. The samples were analyzed at the same time. All titers ≥2 were considered positive (READING; FIELD, 1999).

#### 2.5. Classification of estrous cycle stages

All bitches were submitted to elective ovariohysterectomy (OHE). The classification of estrous cycle phases in bitches was based on vaginal cytology and ovarian histology for pubertal (Table 1) (GROPETTI et al., 2015; PAYAN-CARREIRA et al., 2011; SOKOLOWSKY et al., 1973). For prepubertal, was also taken into account historical data of the animal.

For vaginal cytology, slides were made with vaginal brushes, collected immediately after OHE. The slides were stained with Giemsa and evaluated under a light microscope (POST, 1985; REDDY et al., 2011).

After OHE, the ovaries were removed from the ovarian bursa and fixed in 10% formaldehyde for 12 to 24 hours and kept in 70° alcohol. Subsequently, they were processed to histology, with tissue sections of 3 µm and stained by Harris hematoxylin and eosin (HE).

Table 1. Definition of puberty and estrous cycle stages classification from a group of bitches submitted to elective ovariectomy in the central eastern region of the State of Paraná, according to vaginal cytology and ovarian histology.

<b>Puberty and estrous cycle stages</b>	<b>Vaginal cytology</b>	<b>Ovarian histology</b>
Prepubertal	Parabasal and Intermediate Epithelial Cells	Small primary, secondary and tertiary follicles
Proestrus	Red blood cells, parabasal, intermediate and superficial epithelial cells with neutrophils and bacteria	Small, medium and large tertiary follicles and possible presence of <i>corpus albicans</i>
Estrus	Predominance of superficial epithelial cells and small number of red blood cells	Large luteinized tertiary follicles and/or <i>corpus hemorrhagicum</i>
Diestrus	> Proportion of parabasal and intermediate epithelial cells and large amount of neutrophils	<i>Corpus luteum</i> with cavities and mature compact corpus luteum
Anestrus	Parabasal and Intermediate Epithelial Cells	Small tertiary follicles, absence of hemorrhagic or corpus luteum body and presence of atresic corpus luteum or <i>corpus albicans</i>

## 2.7. Statistical analysis

All data were analyzed using the IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0 Released 2011 (Armonk, NY: IBM Corp) for assessment of risk factors related to the laboratory results. The variables used for the association study were age, puberty, estrus cycle stage, parturition history, mating experience, history of vaginal discharge and history of mating followed or not by gestation. For the study of risk factors in the variables with only two categories, a univariate analysis was performed by the point and interval estimation of the odds ratio (OR), which was considered to be significant when the confidence interval did not include the value 1. Fisher's exact test was calculated with a significance level of 5%, when necessary.

For variables with more than two categories, the Pearson Chi-Square test was performed, with a significance level of 5%.

### 3. RESULTS

The numbers and percentages of animals evaluated for each variable observed in the animal history are presented in Figure 1. A history of abortion was reported for one bitch without any additional information. Some of the owners did not answer all of the questions, so the category "no answer" was included for each variable. These individuals were excluded from the odds ratio analysis for those categories.

All animals tested were negative for *Brucella canis* by the AGID test. All vaginal and ocular mucosa swabs were negative for CaHV-1 by PCR, although our positive control was successfully amplified. Herpesvirus serum neutralization tests were positive in 68.4% (26/38) of bitches, with titers ranging from 2 to 32 (READING; FIELD, 1999). Two samples were considered unsuitable for analysis, and these individuals were also excluded from the analysis of risk factors.

All the animals were followed by a veterinary clinician in the postoperative period, for removal of stitches and clinical reassessment. None of the tutors reported interurrences that could be related with the recidivism of CaHV-1, such as vaginal lesions, respiratory or ophthalmic conditions.

The positive and negative distribution of the variables age group, parturition history and oestrous cycle stages between positive and negative for seroneutralization to herpesvirus and Pearson chi-square association p-values are described in Table 2. The odds ratio analysis between the variables of puberty, mating experience, mating followed by gestation (mating vs. gestation) and vaginal discharge, and the positive serum neutralization tests for CaHV-1 is shown in Table 3. By statistical analysis, none of the variables were associated with seropositivity for CaHV-1.

Variables	
<b>Age group</b>	
0-1 yr	25.0% (10/40)
1-6 yr	55.0% (22/40)
>6 yr	12.5% (5/40)
No answer	7.5% (3/40)
<b>Puberty</b>	
Yes	87.5% (35/40)
No	12.5% (5/40)
<b>Mating experience</b>	
Yes	47.5% (19/40)
No	45.0% (18/40)
No answer	7.5% (3/40)
<b>Mating always followed by gestation</b>	
Yes	63.2% (12/19)
No	36.8% (7/19)
<b>History of vaginal discharge</b>	
No	60.0% (24/40)
Yes (Pus)	7.5% (3/40)
No answer	32.5% (13/40)
<b>Estrus cycle stage</b>	
Proestrus	17.1% (6/35)
Estrus	8.6% (3/35)
Diestrus	20.0% (7/35)
Anestrus	54.3% (19/35)
<b>Parturition</b>	
Nulliparous	52.5% (21/40)
Primiparous	12.5% (5/40)
Multiparous	22.5% (9/40)
No answer	12.5% (5/40)

Figure 1. Variables from a group of 40 bitches submitted to elective ovariectomy in a massive sterilization program in the central eastern region of the State of Paraná, according to data obtained from the general and reproductive history.

Table 2. CaHV-1 serum neutralization positive and negative distribution of the variables studied from a group of 40 bitches submitted to elective ovariectomy in a massive sterilization program in the central eastern region of the State of Paraná and respective Pearson Chi-Square test p-values.

Variables	Outcomes	Serum neutralization		p-values
		Positive	Negative	
Age group	0-1 yr	23	10	0.643
	1-6 yr	2	3	
	>6 yr	12	6	
Parturition	Nulliparous	14	6	0.458
	Primiparous	2	3	
	Multiparous	5	3	
Estrus cycle stage	Proestrus	4	2	0.351
	Estrus	2	1	
	Diestrus	6	0	
	Anestrus	11	7	

Table 3. CaHV-1 serum neutralization positive and negative distribution of the variables studied from a group of 40 bitches submitted to elective ovariectomy in a sterilization program in the central eastern region of the State of Paraná and respective odds ratio (OR), 95% confidence interval (CI 95%) and, when necessary, the Fisher's exact test p-values.

Variables	Outcomes	Serum neutralization		Odds ratio (95% CI)	p-values
		Positive	Negative		
Puberty	Yes	23	10	1.533	0.643
	No	2	3	(0.221- 10.639)	
Mating	Yes	12	6	1.092	1.000
	No	11	6	(0.270-4.408)	
Mating vs. Gestation	No	5	2	1.429	1.000
	Yes	7	4	(0.184-11.085)	
Vaginal discharge	Yes	1	1	0.692	0.670
	No	13	9	(0.038-12.572)	

#### 4. DISCUSSION

In this study, no associations were observed between the variables evaluated (clinical and reproductive history and estrous cycle stages) and the results of the research for *Brucella canis* and CaHV-1.

Since all of the animals in the study had negative results for the detection of antibodies against *Brucella canis* by AGID, we were unable to evaluate potential risks associated. Two serological surveys in southeastern Brazil, analyzed risk factors in dogs and the only risk factor associated with anti-*Brucella canis* antibody titers in dogs in that study was free-roaming behavior (AZEVEDO et al., 2003; DOS REIS et al., 2008)

The routine diagnosis of brucellosis is based on clinical signs, reproductive changes, and serological tests (WANKE, 2004). Studies have previously been done to assess the feasibility of indirect tests for the diagnosis of brucellosis (AZEVEDO et al., 2004; MEGID et al., 2008; MORAES et al., 2009). The AGID test used in our study for the initial screening of *Brucella canis* infection was previously used by other group of researchers; similarly to that study, we did not retest negative test samples by other methods (AZEVEDO et al., 2003). It is important to emphasize that AGID has high specificity, which has been demonstrated in previous work that compared this test with other diagnostic serological techniques (KEID et al., 2009; MORAES et al., 2009).

Despite the high rate of positive results (68.4%; 26/38) for CaHV-1 serum neutralization test, no association was found between the risk factors and herpesvirus infection. A serological and biomolecular herpesvirus survey was performed by Bottinelli et al. (2016) in a breeding kennel in Italy in which assessed risk factors similar to those evaluated in our study, such as age, number of pregnancies, experience with mating and cases of abortion. However, the authors described that all dogs were negative for herpesvirus infection, thus the evaluation of risk factors was not possible. Krogenæs et al. (2014) also failed to find any association between the variables studied and the presence of immunity to herpesvirus, despite 85% of dogs testing serologically were positive. The population studied in Krogenæs et al. (2014) was of breeding bitches from eastern Norway, and the variables evaluated were pregnancy and whelping number, the condition of

previously born puppies, unsuccessful attempts to become pregnant, travel abroad in the past year and participation in competitions in the past year.

For CaHV-1, we used both direct and the indirect diagnostic tests because of the specific characteristics of this infectious agent (i.e., latency). According to Rootwelt et al. (2011), neutralizing antibodies increase after infection and can remain high for a few months, although low titers may be detected for several years. Low titers may also be induced by vaccination, which was not a concern for us since the animals enrolled in our study had never been vaccinated. After the initial acute stage of the disease, the virus can remain latent in ganglia of the nervous system, as well as in lymph nodes and salivary glands (BURR et al., 1996; MIYOSHI et al., 1999).

Despite negative results in the vaginal and ocular samples by PCR, serum neutralization test were positive in 67.5% of the tested animals (27/40), all of which had low titers (between 2 and 32). Based on prevalence surveys from different countries, it is clear that the occurrence of canine herpesvirus in the dog population varies widely and is not exclusively dependent on whether the dog is part of a breeding program (BOTTINELLI et al., 2016; KROGENÆS et al., 2014; NÖTHLING et al., 2008; READING; FIELD, 1998). Reading and Field (1998) found that 76% (247/325) of dogs from a diverse population in England were seropositive. Of these 247 positive animals, 204 had the titers that were similar to those reported in our study (2 to 32). Krogenæs et al. (2014) reported a seropositivity of 85.5% (165/193) in a population of breeding bitches from eastern Norway. Since these researchers used other serum neutralization technique than ours, they also had a different cut off for the titers (positive above 80), and 38.8% of positive animals were classified as weakly positive.

Both of these pathogens remain latent in the canine host, and there are no specific treatments or preventive measures for eradicating these infections. Even in the absence of clinical symptoms, dogs may become carriers in cases of pathogen reactivation. Despite the herpesvirus negativity by PCR in our study, the high level of seropositivity confirms the circulation of this pathogen in this population, especially since vaccines against CaHV-1 are not licensed for use in Brazil. According to Reading and Field (1998), it is assumed that most seropositive dogs are CaHV-1 carriers and may be potential transmitters in cases of infection recurrence.

Reactivation of the infection can occur as a result of many stressors and immunosuppressive drugs, and the subsequent symptoms may not be related to the

reproductive tract (LEDBETTER et al., 2009). In addition, viral shedding can occur for long periods of time, putting animals that live in the same environment at risk (REYNES et al., 2012).

Both CHV-1 and *Brucella canis* are infectious agents of concern among researchers and breeders. Epidemiological studies have been undertaken to clarify the distribution of these pathogens in some regions (AZEVEDO et al., 2003; BOTTINELLI et al., 2016; KROGENÆS et al., 2014; LARSEN et al., 2015; READING; FIELD, 1998). These studies found wide distributions of CaHV-1 and *Brucella canis* infections, highlighting the need for local studies to ascertain the real prevalence of these agents in targeted populations.

In conclusion, our study found that this population of canine females that were previously strays showed no evidence of contact with *Brucella canis*. The high prevalence of individuals with antibody titers against canine herpesvirus indicates that this pathogen is somewhat endemic in central eastern Brazil. Under the conditions in which the present work was developed, there seems to be no association between risk factors and the agents studied.

### **Acknowledgements**

The authors express their gratitude to Prof. Carmen Lúcia Scortecci Hilst for all of her support in the collection of samples; to Prof. João Pessoa Araújo Júnior (Unesp, Botucatu, SP, Brazil), who kindly provided the canid alphaherpesvirus 1 strain isolate for the serum neutralization analysis; to the Graduate Program in Animal Science (UEL) for its financial support, and to the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for granting the PhD scholarship.

### REFERENCES

- ALFIERI, A. A., PARAZZI, M. E., TAKIUCHI, E., MÉDICI, K. C., & ALFIERI, A. F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. **Tropical Animal Health and Production**, v. 38, n. 7-8, p. 521-526, 2006.
- ARAS, Z; UÇAN, U S. Detection of *Brucella canis* from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, p. 658-662, 2010.

AZEVEDO, S. S.; VASCONCELLOS, S. A.; ALVES, C. J.; KEID, L. B.; GRASSO, L. M.; MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S. R. Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 156-160, 2003.

AZEVEDO, S. S.; VASCONCELLOS, S. A.; KEID, L. B.; GRASSO, L. M. P. S.; PINHEIRO, S. R.; MASCOLLI, R.; ALVES, C. J. Comparação de três testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 106-112, 2004.

BOTTINELLI, M.; RAMPACCI, E.; STEFANETTI, V.; MARENZONI, M. L.; MALMLOV, A. M.; COLETTI, M.; PASSAMONTI, F. Serological and biomolecular survey on canine herpesvirus-1 infection in a dog breeding kennel. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 5, p. 797-802, 2016.

BOOM, R. C. J. A., SOL, C. J., SALIMANS, M. M., JANSEN, C. L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M., VAN DER NOORDAA, J. P. M. E. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BRENNAN, S. J., NGELEKA, M., PHILIBERT, H. M., FORBES, L. B., & ALLEN, A. L. Canine brucellosis in a Saskatchewan kennel. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 49, n. 7, p. 703, 2008.

BURR, P. D., CAMPBELL, M. E. M., NICOLSON, L., ONIONS, D. E. Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 227-237, 1996.

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. **The Cornell Veterinarian**, v. 78, n. 1, p. 63-73, 1988.

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**, v. 55, n. 7, p. 1509-1519, 2001.

DOS REIS, C. B. M.; HOFFMANN, R. C.; DA SILVA SANTOS, R.; TURRI, R. D. J. G.; DE GODOY ORIANI, M. R. Pesquisa de anticorpos anti-Brucella canis e anti-Brucella abortus em cães errantes da cidade de São João da Boa Vista, Estado de São Paulo, Brasil (2002-2003). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 1, p. 32-34, 2008.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 69, p. 237IN17-250IN18, 1959.

EVERMANN, J. F.; SELLON, R. K.; SYKES, J. E. Viral, Rickettsial, and Chlamydial Diseases. In: **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 2012. Chapter 1, p. 1–9.

FERNANDES, A. R. F.; AZEVEDO, S. S. D.; PIATTI, R. M.; PINHEIRO, E. S.; GENOVEZ, M. É.; AZEVEDO, A. S. D.; BATISTA, C. S. A.; ALVES, C. J. *Brucella canis* infection in dogs attended in veterinary clinics from Patos, Paraíba state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1405-1408, 2011.

GROPPELTI, D.; ARALLA, M.; BRONZO, V.; BOSI, G.; PECILE, A.; ARRIGHI, S. Perioovulatory time in the bitch: what's new to know?: Comparison between ovarian histology and clinical features. **Animal Reproduction Science**, v. 152, p. 108-116, 2015.

KEID, L. B., SOARES, R. M., VASCONCELLOS, S. A., MEGID, J., SALGADO, V. R., RICHTZENHAIN, L. J. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 1, p. 22-26, 2009.

KROGENÆS, A., ROOTWELT, V., LARSEN, S., RENSTRÖM, L., FARSTAD, W., LUND, A. A serological study of canine herpesvirus-1 infection in a population of breeding bitches in Norway. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, n. 1, p. 1, 2014.

LARSEN, R. W., KIUPEL, M., BALZER, H. J., & AGERHOLM, J. S. Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, n. 1, p. 1, 2015.

LEDBETTER, E. C., KIM, S. G., DUBOVI, E. J., BICALHO, R. C.. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 1, p. 98-105, 2009.

MARZETTI, S., CARRANZA, C., RONCALLO, M., ESCOBAR, G. I., LUCERO, N. E. Recent trends in human *Brucella canis* infection. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 55-61, 2013.

MEGID, J.; SALGADO, V.R.; KEID, L.B.; SIQUEIRA, A.K.; CRUZ, T.F.; GRINSPAN, J.; LISTONI, F.J.P.; PAES, A.C. Abortamento canino por *Brucella canis*: relato de caso. **Veterinaria e Zootecnia**, v.15, n.3, p.445-448, 2008.

MIR, F.; FONTAINE, E.; ALBARIC, O.; GREER, M.; VANNIER, F.; SCHLAFER, D. H.; FONTBONNE, A. Findings in uterine biopsies obtained by laparotomy from bitches with unexplained infertility or pregnancy loss: an observational study. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 312-322, 2013.

MIYOSHI, M., ISHII, Y., TAKIGUCHI, M., TAKADA, A., YASUDA, J., HASHIMOTO, A., KIDA, H. Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 4, p. 375-379, 1999.

MORAES, C. C. G. D., MEGID, J., SOUZA, L. C. D., MENESES, A. M. C., CROCCI, A. J., SANTOS, R. B. Imunodifusão em gel de agar e soroaglutinação rápida para a detecção de anticorpos Anti-" *Brucella canis*". **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, 2009.

NÖTHLING, J. O.; HÜSSY, D.; STECKLER, D.; ACKERMANN, M. Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa. **Theriogenology**, v. 69, n. 3, p. 276-282, 2008.

OKKENS AC, BEVERS MM, DIELEMANB SJ, VAN HAAFTEN B, VAN SLUIJS FJ. Fertility problems in the bitch. **Animal Reproduction Science**, v 28, pp 379-387, 1992.

OLIVEIRA, E. C., SONNE, L., BEZERRA JÚNIOR, P. S., TEIXEIRA, E. M., DEZENGRINI, R., PAVARINI, S. P., DRIEMEIER, D. Achados clínicos e patológicos em cães infectados naturalmente por herpesvírus canino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 637-642, 2009.

OLIVEIRA, M. Z. D., VALE, V., KEID, L., FREIRE, S. M., MEYER, R., PORTELA, R. W., BARROUIN-MELO, S. M. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. **Research in Veterinary Science**, v. 90, n. 3, p. 425-431, 2011.

PAYAN-CARREIRA, R.; PIRES, M. A.; STRÖM HOLST, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Tumour necrosis factor in the canine endometrium: an immunohistochemical study. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 3, p. 410-418, 2011.

PRETZER, S. D. Bacterial and protozoal causes of pregnancy loss in the bitch and queen. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 320-326, 2008.

POST, K. Canine vaginal cytology during the estrous cycle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 26, n. 3, p. 101, 1985.

READING, M. J.; FIELD, H. J. A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population. **Archives of Virology**, v. 143, n. 8, p. 1477-1488, 1998.

READING, Mark J.; FIELD, Hugh J. Detection of high levels of canine herpes virus-1 neutralising antibody in kennel dogs using a novel serum neutralisation test. **Research in Veterinary Science**, v. 66, n. 3, p. 273-275, 1999.

REDDY, K. C. S.; RAJU, K. G. S.; RAO, K. S.; RAO, K. B. R. Vaginal cytology, vaginoscopy and progesterone profile: breeding tools in bitches. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 25, n. 2, p. 51-54, 2011.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

REYNES, E., LÓPEZ, G., AYALA, S. M., HUNTER, G. C., LUCERO, N. E. Monitoring infected dogs after a canine brucellosis outbreak. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 6, p. 533-537, 2012.

RON SSE, V.; VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K.; FARNIR, F.; POULET, H. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 619-636, 2004.

RON SSE, V., VERSTEGEN, J., THIRY, E., ONCLIN, K., AEBERLÉ, C., BRUNET, S., POULET, H. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. **Theriogenology**, v. 64, n. 1, p. 61-74, 2005.

ROOTWELT, V.; LUND, A.; KROGENÆS, A. Herpes virus infection in the dog—a review. **Animal Practice**, v. 21, p. 31, 2011.

SANT'ANNA, M. C.; FABRETTI, A. K.; MARTINS, M. I. M. Clinical approach to canine vaginitis. **Semina. Ciências Agrárias (Online)**, v. 33, p. 1543-1554, 2012.

SCHLAFER, D. H. Diseases of the canine uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s6, p. 318-322, 2012.

SMITH, K. C. Herpesviral abortion in domestic animals. **The Veterinary Journal**, v. 153, n. 3, p. 253-268, 1997.

SOKOLOWSKI, J. H.; ZIMBELMAN, R. G.; GOYINGS, L. S. Canine reproduction: reproductive organs and related structures of the nonparous, parous, and postpartum bitch. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 8, p. 1001, 1973.

STRÖM HOLST, B., HAGBERG GUSTAVSSON, M., GRAPPERON-MATHIS, M., LILLIEHÖÖK, I., JOHANNISSON, A., ISAKSSON, M., AXNÉR, E. Canine Herpesvirus During Pregnancy and Non-Pregnant Luteal Phase. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s6, p. 362-365, 2012.

TUMMARUK, P.; KESDANGSAKONWUT, S.; PRAPASARAKUL, N.; KAEOKET, K. Endometritis in gilts: reproductive data, bacterial culture, histopathology, and infiltration of immune cells in the endometrium. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 6, p. 575-584, 2010.

WANKE, M. M. Canine brucellosis. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 195-207, 2004.

WANKE, M. M.; DELPINO, M. V.; BALDI, P. C. Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial). **Theriogenology**, v. 66, n. 6, p. 1573-1578, 2006.

VERSTEGEN J, DHALIWAL G, VERSTEGEN-ONCLIN K. Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review. **Theriogenology**, v 70, pp 304–319, 2008.

**5 ARTIGO B**

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOMORFOMÉTRICA DO ÚTERO DE CADELAS  
HÍGIDAS PRÉ-PÚBERES E PÚBERES**

## CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOMORFOMÉTRICA DO ÚTERO DE CADELAS HÍGIDAS PRÉ-PÚBERES E PÚBERES

Rebeca Cordeiro Justino<sup>1</sup>, Elisangela Olegário da Silva<sup>2</sup>, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense<sup>2</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Reproa. Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. \* Autor correspondente: [imartins@uel.br](mailto:imartins@uel.br)

### RESUMO

Uma das dificuldades em estabelecer parâmetros para o diagnóstico preciso de alterações uterinas pode estar no conhecimento das alterações endometriais fisiológicas que ocorrem em cada fase do ciclo estral canino. O objetivo deste estudo foi descrever e relacionar as modificações uterinas encontradas pela histomorfometria, contagem de células inflamatórias infiltradas em endométrio e imunomarcagem para ciclooxygenase-2 (COX-2) no endométrio de cadelas pré-púberes e púberes. Foram utilizadas 21 cadelas sem alterações uterinas diagnosticadas em histomorfologia. Foram realizadas citologia vaginal, colheita de fragmento de cornos uterinos e ovários, morfometria uterina, contagem de células inflamatórias endometriais e imuno-histoquímica para COX-2 dos fragmentos uterinos. A citologia vaginal e histologia ovariana foram utilizadas para identificação de fase do ciclo estral. Os resultados apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em todas as avaliações histomorfométricas, com exceção da razão endométrio/miométrio. Apesar de não serem encontradas diferenças estatísticas nas contagens de células inflamatórias imunomarcadas em endométrio uterino para COX-2 entre as cadelas avaliadas, observaram-se quase dez vezes mais células marcadas nas fases do proestro e anestro quando comparadas as fases de estro e diestro. Conclui-se que, mesmo não sendo observadas diferenças estatísticas entre as fases do ciclo, os resultados obtidos nas avaliações de contagem de células inflamatórias endometriais e expressão proteica da COX-2 em endométrio de

cadelas hípidas podem ser utilizados como parâmetros para comparação com alterações inflamatórias uterinas que ocorrem na cadela.

Palavras-chave: Ciclo estral, Ciclooxigenase-2, Endométrio, Leucócitos, Parede uterina.

## 1. INTRODUÇÃO

As modificações histomorfológicas que ocorrem durante o ciclo estral no útero de cadelas hípidas têm sido estudadas desde o início do século passado (MARSHALL; JOLLY, 1906). As camadas da parede uterina das cadelas são formadas pelo endométrio, miométrio, sendo este subdividido em camada circular, estrato vascular e camada longitudinal e pela serosa (BUDRAS et al., 2007). Todas sofrem transformações de acordo com as fases do ciclo estral (SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973). O endométrio canino é dividido em três regiões histológicas: área superficial, que abrange epitélio superficial e a abertura das criptas glandulares; área intermediária, composta principalmente de tecido conjuntivo e apresenta a continuação de algumas glândulas da área superficial; e área basal, onde há glândulas endometriais anastomosadas e espiraladas, terminando próximas ao miométrio (BARRAU et al., 1975; PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015).

A determinação quantitativa e qualitativa de células inflamatórias infiltradas no endométrio tem se mostrado eficiente em algumas espécies no diagnóstico de algumas alterações uterinas, e o padrão de normalidade já foi estabelecido para a espécie suína (DALIN; KAEOKET; PERSSON, 2004; KAEOKET; PERSSON; DALIN, 2001; SEGABINAZZI et al., 2017). Em cães, a estimativa de células inflamatórias infiltradas no endométrio canino saudável nas fases do ciclo estral, foi realizada por imuno-histoquímica para a detecção de macrófagos, linfócitos T e B, sendo observada diferença significativa apenas nos valores de linfócitos T, apresentado maiores contagens no proestro e anestro (PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015).

Apesar da contagem de células inflamatórias endometriais ser um interessante exame para o auxílio do diagnóstico de alterações uterinas subclínicas, em especial a endometrite, sua interpretação pode ser influenciada por causas fisiológicas, que podem alterar a composição e intensidade do infiltrado inflamatório,

como fases do ciclo estral e a inseminação e/ou cópula (ENGLAND; RUSSO; FREEMAN, 2013; PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015).

A enzima prostaglandina H sintetase 2 (ciclooxigenase 2; COX-2) desempenha um importante papel no trato reprodutivo feminino, sendo responsável pela formação das prostaglandinas envolvidas nos processos reprodutivos considerados pró-inflamatórios, como a ovulação e implantação embrionária (HINZ; BRUNE, 2002; LIM et al., 1997). Em mulheres saudáveis, a expressão de COX-2 foi observada no epitélio luminal e nas regiões perivasculares do endométrio, sendo o uso crônico de anti-inflamatórios não esteroidais associado à infertilidade (MARIONS; DANIELSSON, 1999; NAVARRO; BAGNOLLI, 2001).

No cão, constatou-se a maior expressão gênica e proteica de COX-2 no corpo lúteo de cadelas no início do diestro não gravídico, quando comparado com outros momentos dessa mesma fase, correlacionando esse achado com um efeito luteotrófico (KOWALEWSKI et al., 2006). No trato urinário dessa mesma espécie, foi pesquisada a expressão da COX-2 em bexiga e uretra de cadelas em anestro e cadelas submetidas à ovariectomia, sendo observadas maior expressão e imunomarcagem de COX-2 em animais não castrados (PONGLOWHAPAN; CHURCH; KHALID, 2009).

Existe a necessidade de se estabelecer parâmetros para o diagnóstico preciso de alterações uterinas, principalmente as que podem estar relacionadas com falhas na fertilidade, e o conhecimento das modificações fisiológicas pode elucidar muitas dúvidas relacionadas a eventos que se confundem com alterações patológicas, como ocorre no caso das endometrites pós-cruzamento (ENGLAND; BURGESS; FREEMAN, 2012; TROEDSSON, 2014).

O objetivo deste estudo foi descrever e relacionar os achados das avaliações histomorfométricas uterinas que ocorrem em cadelas híginas pré-púberes e púberes durante as fases do ciclo estral, com a contagem de células inflamatórias endometriais e a imunomarcagem de endométrio para COX-2.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Animais e histórico

Foram utilizadas 21 cadelas, com idade entre 5 meses a 15 anos, pesando entre 5 a 29 kg, sem raça definida. Todos os animais foram submetidos à ovariectomia eletiva. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética institucional CEUA 28647.2013.53.

Informações gerais e do *status* reprodutivo dos animais foram fornecidos por seus tutores. Foram incluídas nas avaliações informações sobre faixa etária, puberdade (observação do primeiro cio), histórico de cópula (se copulou e quantas vezes), histórico de partos (se ocorreu e quantas vezes), histórico de uso de anticoncepcional (se usou e quantas vezes).

## 2.2. Exame histológico uterino

Foi colhido um fragmento da porção média de cada corno uterino. Os tecidos foram fixados por 12 a 24 horas em solução de formaldeído tamponado à 10%, e mantidos em álcool 70%. Posteriormente, foram submetidas à desidratação, diafanização, inclusão em parafina e secções de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ , coradas por hematoxilina de Harris e eosina (HE).

A morfometria uterina foi realizada nas seguintes regiões (cinco campos aleatórios cada): parede uterina total, miométrio total, camada muscular circular, camada muscular longitudinal e estrato vascular e endométrio total conforme Monteiro e colaboradores (2009). As fotomicroscopias foram realizadas e avaliadas utilizando o programa Motic Images plus 2.0 nas objetivas de 2,5x, 10x e 20x.

O número de células inflamatórias foi avaliado no endométrio nas camadas superficial e basal. A camada intermediária ficou dividida entre as duas camadas anteriormente citadas. Para cada corte, o número de células foi contado em quatro campos aleatoriamente selecionados em cada camada, totalizando 8 campos por animal, utilizando para isso um microscópio de luz e uma objetiva de 40x. A área total mensurada por animal foi de 1272  $\text{mm}^2$  (159,1 $\text{mm}^2$ /campo). A área total mensurada por camada em cada corte foi de 636,4 $\text{mm}^2$ . A contagem de células foi estimada pela soma de cada tipo celular por área endometrial avaliada (Adaptado de PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015).

### 2.3. Exame imuno-histoquímico

A expressão proteica de COX-2 foi avaliada por meio de exame imuno-histoquímico. Para tanto, fragmentos de 3µm de espessura em lâminas silanizadas foram submetidos à recuperação antigênica com solução de citrato de sódio pH 6,0 em panela de pressão, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metanol (100: 50 mL) em câmara escura seguido de bloqueador de proteína (Dako®). Após estas etapas, os fragmentos foram incubados com anticorpo primário anti-cox-2 (clone CX-294, diluição 1:100, Dako®) por 18 horas a 4°C em câmara úmida. O anticorpo secundário (Nichirei Biosciences ®) foi aplicado sobre os cortes histológicos por 30 minutos em temperatura ambiente seguido da revelação com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina - Dako®), contracolorados com hematoxilina e os controles positivo e negativo foram usados de acordo com as recomendações do fabricante. Procedeu-se a desidratação do material com banhos de álcool e foram montadas com selante e lamínulas.

Para as avaliações, o endométrio foi dividido em três grupos celulares: epitélio luminal, epitélio glandular e células inflamatórias presentes no estroma endometrial (adaptado de VEIGA et al., 2017). Os dois primeiros grupos celulares foram avaliados (epitélio luminal e glandular) em toda a extensão uterina, com auxílio de objetiva de 20x, recebendo dois escores: extensão de 0 a 3 (sendo 0 = ausente, 1 = focal, 2 = multifocal, 3 = difusa) e intensidade de 0 a 3 (sendo 0 = negativo, 1 = fraco, 2 = moderado, 3 = intenso). Para o terceiro grupo celular, foi realizada a contagem das células marcadas, utilizando a mesma metodologia empregada para a contagem de células inflamatórias endometriais, e a avaliação subjetiva da intensidade de 0 a 3 (sendo 0 = negativo, 1 = fraco, 2 = moderado, 3 = intenso) de cada campo avaliado.

### 2.4. Classificação das fases do ciclo estral

A classificação das fases do ciclo estral foi baseada na citologia vaginal e histologia ovariana (GROPETTI et al., 2015; PAYAN-CARREIRA et al., 2011; REDDY et al., 2011; POST, 1985; SOKOLOWSKY et al., 1973).

No pós-óperatório imediato, lâminas confeccionadas com swabs vaginais foram coradas com Giemsa e avaliadas em microscópio de luz (POST, 1985). Foram

identificadas as proporções das células epiteliais parabasais, intermediárias e superficiais, presença de leucócitos, hemácias, bactérias e muco.

Os ovários foram removidos da *bursa* ovariana e processados para avaliação histológica assim como os fragmentos uterinos, sendo as lâminas avaliadas em microscópio de luz nas objetivas de 4 e 10x.

O anestro foi classificado devido presença de células parabasais e intermediárias em citologia vaginal e histologia ovariana com folículos terciários pequenos, ausência de corpo hemorrágico ou lúteo e presença de corpo lúteo atrésico ou corpo *albicans*.

No proestro, foi observado citologia vaginal com presença de hemácias, células epiteliais parabasais, intermediárias e superficiais junto com neutrófilos e bactérias. Na histologia ovariana foram observados folículos terciários pequenos, médios e grandes e possível presença de corpo *albicans*.

O estro foi identificado pela predominância de células superficiais e pequeno número de hemácias em citologia vaginal e histologia ovariana com folículos terciários grandes luteinizados e/ou corpo hemorrágico.

No diestro as cadelas apresentaram citologia vaginal com maior número de células epiteliais parabasais e intermediárias e grande quantidade de neutrófilos. A histologia ovariana mostrou corpo lúteo com cavidades e corpo lúteo compacto maduro.

Para a classificação de pré-púberes foi levado em consideração os dados do histórico reprodutivo, a citologia vaginal contendo células parabasais e intermediárias, e histologia ovariana com folículos primários, secundários e terciários pequenos.

## 2.5. Análise estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados pelo programa IBM SPSS Statistics for Windows, versão 20.0/ 2011 (Armonk, NY: IBM Corp), com nível de significância de 5%.

Foi realizada primeiramente a avaliação de normalidade pelo teste Shapiro-Wilks, após constatação de grupos de variáveis paramétricas e não paramétricas, foram realizados testes específicos para cada conjunto de dados. Para variáveis não paramétricas que possuíam até duas categorias foi utilizado o Mann-Whitney

(Wilcoxon Rank Sun teste) bilateral. Para variáveis não paramétricas que possuíam 3 ou mais categorias foi realizado o Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney (Wilcoxon Rank Sun teste) bilateral para comparação a cada 2 grupos. Para variáveis paramétricas que possuíam até duas categorias foi utilizado o teste t. Para variáveis paramétricas que possuíam 3 ou mais categorias foi realizado o ANOVA seguido do teste t para comparação a cada 2 grupos.

### 3. RESULTADOS

De acordo com a citologia vaginal e a histologia ovariana para avaliação da fase do ciclo estral (Figura 1), 23,8% das cadelas estavam no proestro (5/21), 9,5% no estro (2/21), 14,3% no diestro (3/21), 28,6% no anestro (6/21). Dos animais avaliados, 23,8% se apresentavam ainda pré-púberes (5/21).

As distribuições dos animais púberes em cada uma das fases do ciclo estral dentro de cada uma das variáveis provenientes do seu histórico estão descritas na Tabela 1. Todos os animais classificados como pré-púberes apresentaram idade abaixo de um ano.

Os resultados das avaliações morfométricas das cadelas pré-púberes e de acordo com as fases do ciclo estral estão descritos nas Tabelas 2 e 3.

A contagem das células inflamatórias no endométrio canino das cadelas pré-púberes e de acordo com as fases do ciclo estral está descrita na Tabela 4.

Não houve marcação das células do epitélio luminal e glandular endometrial nos animais avaliados nesse estudo. Os resultados referentes à imunomarcação das células inflamatórias presentes no estroma endometrial pela COX-2 das cadelas pré-púberes e de acordo com as fases do ciclo estral estão descritos na Tabela 6 (contagem e intensidade de marcação).

As cadelas nas fases do anestro e proestro apresentaram maior número de células inflamatórias marcadas no endométrio, enquanto que os animais nas fases do estro e diestro apresentaram menor marcação (Figura 2).

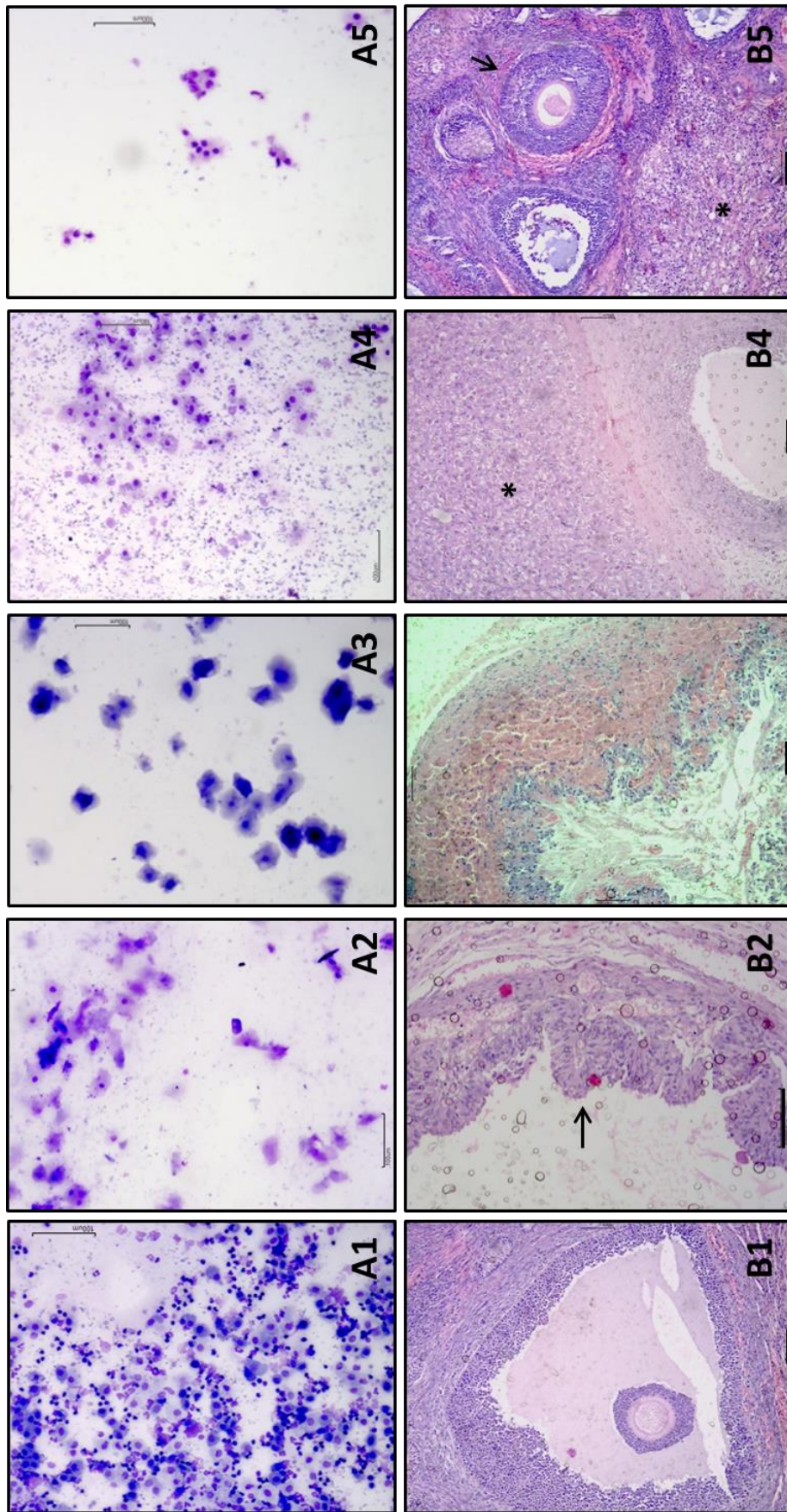


Figura 1. Histologia ovariana e citologia vaginal em diferentes fases do ciclo estral de cadelas submetidas a castração eletiva. A- Citologia vaginal. Coloração Giemsa. A1- Proestro: células epiteliais intermediárias e superficiais, com inúmeros leucócitos e hemáceas. A2- Estro pré-ovulação: células epiteliais superficiais em maior proporção, algumas células epiteliais intermediárias e hemáceas. A3- Estro pós-ovulação: predominância de células superficiais, presença de bactérias e fundo de lâmina bem limpo. A4- Diestro: células epiteliais intermediárias, leucócitos e presença de bactérias. A5- Anestro: poucas células epiteliais parabasais e intermediárias observadas em aglomerados. Objetiva de 10x, barra de 100µm. B- Histologia ovariana. Coloração H&E. B1- Proestro: Folículo terciário (antral). B2- Diestro: corpo lúteo maduro (seta). B3- Estro pré-ovulação: Folículo pré-ovulatório com camada de células da granulosa luteinizada (seta). B4- Diestro: corpo lúteo atresico (\*) e folículos secundário (seta). B5- Anestro: corpo lúteo atresico (\*) e folículos secundário (seta). Objetiva de 10x, barra de 100µm.

Tabela 1. Distribuições das fases do ciclo estral em diferentes grupos de variáveis presentes no histórico geral e reprodutivo, de cadelas hígdas submetidas à ovariectomia eletiva.

Variável	Fases do ciclo			
	Proestro	Estro	Diestro	Anestro
Faixa etária				
<1 ano (5/16)	60,0% (3/5)	20,0% (1/5)	20,0% (1/5)	0% (0/5)
1-6 anos (8/16)	12,5% (1/8)	12,5% (1/8)	12,5% (1/8)	62,5% (5/8)
> 6 anos (3/16)	33,3% (1/3)	0% (0/3)	33,3% (1/3)	33,3% (1/3)
Histórico de Cruza				
Não (8/16)	50,0% (4/8)	12,5% (1/8)	25,0% (2/8)	12,5% (1/8)
Sim (8/16)	12,5% (1/8)	12,5% (1/8)	12,5% (1/8)	62,5% (5/8)
Anticoncepcional				
Não usou (8/15)	37,5% (3/8)	25,0% (2/8)	12,5% (1/8)	25,0% (2/8)
1 vez (1/15)	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
2 vezes (4/15)	0% (0/4)	0% (0/4)	25,5% (1/4)	75% (3/4)
≥ 3 vezes (2/15)	0% (0/2)	0% (0/2)	50,0% (1/2)	50,0% (1/2)
Número de partos				
Nulípara (8/16)	50,0% (4/8)	12,5% (1/8)	25,0% (2/8)	12,5% (1/8)
Primípara (2/16)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	100% (2/2)
Multípara (6/16)	16,7% (1/6)	0% (0/6)	16,7% (1/6)	50,0% (3/6)

\* Os valores não somam o n total das fases, pois não foram consideradas nas variáveis do histórico geral e reprodutivo sem resposta

Tabela 2. Média ( $\pm$  desvio padrão) das espessuras ( $\mu\text{m}$ ) camada muscular circular e mediana (mín - máx) das espessuras ( $\mu\text{m}$ ) da camada muscular longitudinal e estrato vascular de útero de cadelas hígdas pré-púberes e púberes em diferentes fases do ciclo estral, submetidas à ovariectomia eletiva.

Variáveis	Camada muscular ( $\mu\text{m}$ )		
	Circular M( $\pm$ DV)	Estrato vascular MD (Mín - Máx)	Longitudinal MD (Mín - Máx)
Pré-púbere (5/21)	235,4( $\pm$ 154,7)a	176,8(131,2-218,2)a	150,8(133,5-168,3)a
Proestro (5/21)	307,5( $\pm$ 176,0)ab	217,1(206,5-578,2)b	165,8(104,0-330,2)a
Estro (2/21)	498,6( $\pm$ 65,8)bc	475,8(262,1-689,6)ab	385,8(322,4-449,2)a
Diestro (3/21)	732,0( $\pm$ 77,9)d	1040,2(466,6-1114,1)b	816,3(574,9-824,5)b
Anestro (6/21)	421,5( $\pm$ 208,7)ac	416,8(196,0-691,6)b	289,2(104,4-649,9)a
p-valor	0,011	0,015	0,020

MD = mediana, M = média, DV = desvio padrão. Letras diferentes nas colunas indicam significância ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3. Média ( $\pm$  desvio padrão) das espessuras ( $\mu\text{m}$ ) do endométrio, camada muscular total e parede uterina de útero de cadelas híginas pré-púberes e púberes em diferentes fases do ciclo estral, submetidas à ovariectomia eletiva.

Variáveis	Endométrio ( $\mu\text{m}$ ) M( $\pm$ DV)	Camada muscular ( $\mu\text{m}$ ) M( $\pm$ DV)	Parede uterina ( $\mu\text{m}$ ) M( $\pm$ DV)
Pré-púbere (5/21)	795,0( $\pm$ 220,8)a	555,7( $\pm$ 220,5)a	1431,5( $\pm$ 485,7)a
Proestro (5/21)	1123,0( $\pm$ 426,7)ab	891,2( $\pm$ 449,2)ab	1819,3( $\pm$ 719,8)ab
Estro (2/21)	1442,8( $\pm$ 144,4)b	1313,9( $\pm$ 327,5)b	2784,1( $\pm$ 101,7)bc
Diestro (3/21)	1359,8( $\pm$ 133,4)b	2288,5( $\pm$ 264,0)c	3654,6( $\pm$ 415,1)c
Anestro (6/21)	913,1( $\pm$ 267,1)a	1194,4( $\pm$ 492,6)b	2076,4( $\pm$ 811,9)ab
p-valor	0,042	<0,001	0,003

M = média, DV = desvio padrão. Letras diferentes nas colunas indicam significância ( $p < 0,05$ ).

Tabela 4. Média ( $\pm$  desvio padrão) e mediana (mín - máx) dos valores referentes ao número de células inflamatórias presentes na camada superficial do endométrio ( $636,2\text{mm}^2$ ) em cadelas híginas pré-púberes e púberes em diferentes fases do ciclo estral, submetidas à ovariectomia eletiva.

Variáveis	Camada endometrial superficial		
	Linfócitos M( $\pm$ DV)	Plasmócitos MD (Mín-Máx)	Neutrófilos MD (Mín-Máx)
Pré-púbere (5/21)	69,4( $\pm$ 30,4)	0(0-4)	1(0-3)
Proestro (5/21)	68,6( $\pm$ 10,1)	0(0-0)	0(0-13)
Estro (2/21)	73,0( $\pm$ 2,8)	0(0-0)	0(0-0)
Diestro (3/21)	40,3( $\pm$ 13,0)	0(0-0)	0(0-0)
Anestro (6/21)	71,2( $\pm$ 18,2)	1(0-4)	0(0-16)
p-valor	0,244	0,232	0,482

M = média, DV = desvio padrão, MD = mediana.

Tabela 5. Média ( $\pm$  desvio padrão) e mediana (mín - máx) dos valores referentes ao número de células inflamatórias presentes no endométrio total ( $1272\text{mm}^2$ ) em cadelas híginas pré-púberes e púberes em diferentes fases do ciclo estral, submetidas à ovariectomia eletiva.

Variáveis	Camada endometrial total		
	Linfócitos M( $\pm$ DV)	Plasmócitos MD (Mín-Máx)	Neutrófilos MD (Mín-Máx)
Pré-púbere (5/21)	105,0( $\pm$ 57,1)	0(0-1)	2(0-4)
Proestro (5/21)	119,6( $\pm$ 23,2)	0(0-19)	1(0-14)
Estro (2/21)	124,0( $\pm$ 15,6)	2(0-3)	1(0-1)
Diestro (3/21)	47,0( $\pm$ 16,1)	0(0-0)	0(0-1)
Anestro (6/21)	132,3( $\pm$ 49,9)	3(0-36)	1(0-16)
p-valor	0,111	0,271	0,617

M = média, DV = desvio padrão, MD = mediana.

Tabela 6. Média ( $\pm$  desvio padrão) dos valores referentes às contagens de células inflamatórias do estroma endometrial imunomarcadas para COX-2 e a mediana (mín - máx) de suas respectivas intensidades de marcação, em cadelas híginas pré-púberes e púberes, submetidas à ovariectomia eletiva.

Variáveis	Camada endometrial superficial		Camada endometrial total	
	Células	Intensidade	Células	Intensidade
	M( $\pm$ DV)	MD (Mín-Máx)	M( $\pm$ DV)	MD (Mín-Máx)
Pré-púbere (5/21)	27,4( $\pm$ 10,4)	1(1-3)	48,6( $\pm$ 15,0)	1(1-2)
Proestro (5/21)	31,2( $\pm$ 32,0)	1(1-3)	61,8( $\pm$ 63,3)	1(1-2)
Estro (2/21)	2,5( $\pm$ 3,5)	1(0-2)	4,5( $\pm$ 6,3)	1(0-1)
Diestro (3/21)	5,3( $\pm$ 6,8)	1(0-3)	8,7( $\pm$ 8,1)	1(0-3)
Anestro (6/21)	38,0( $\pm$ 17,6)	1(1-2)	73,8( $\pm$ 30,9)	1(1-2)
p-valor	0,116	0,920	0,089	0,516

M = média, DV = desvio padrão, MD = mediana.

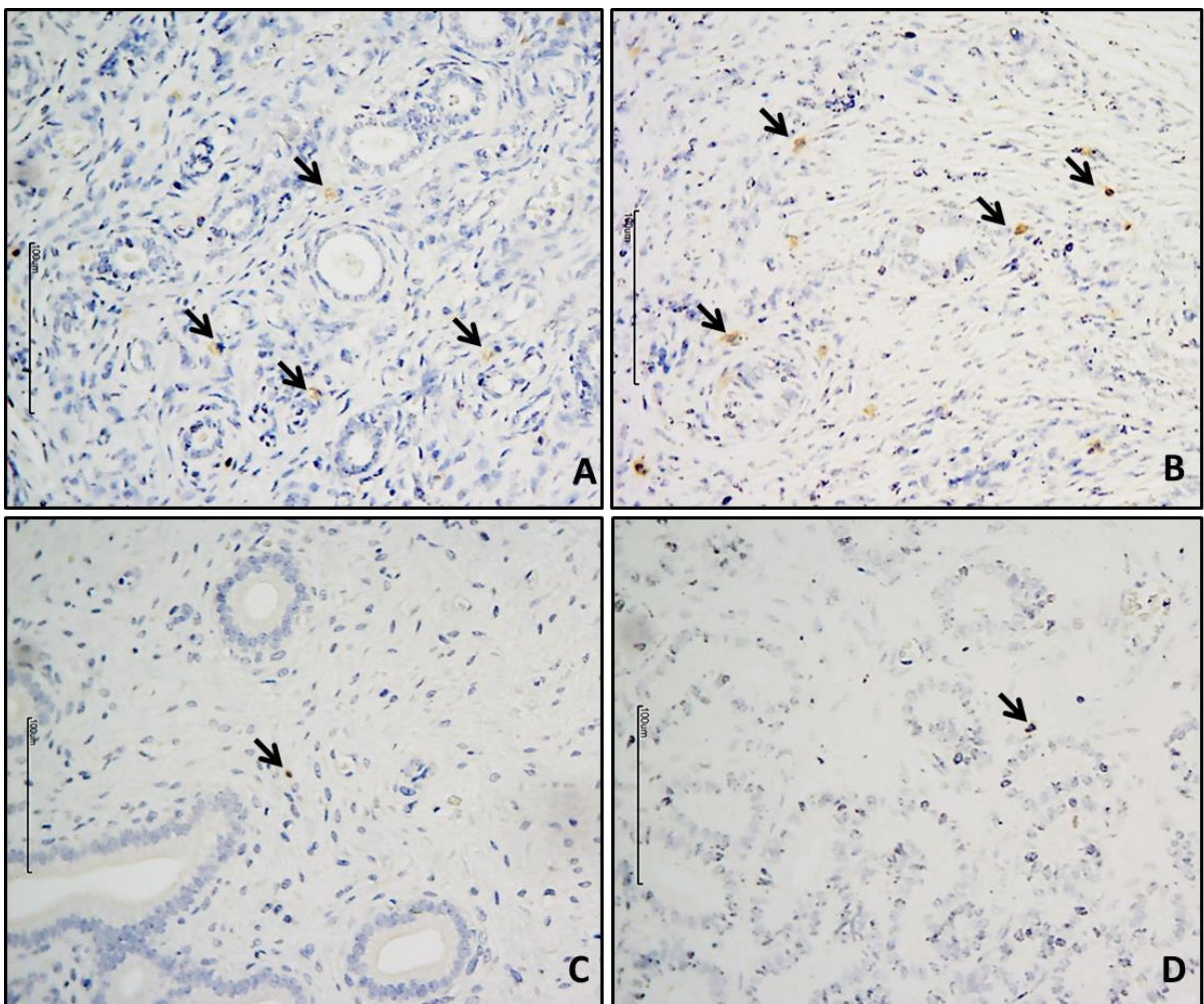


Figura 2. Imunomarcagem para COX-2 de células inflamatórias do estroma endometrial de cadelas sem alterações uterinas em diferentes fases do ciclo estral (setas). A- Anestro. B- Proestro. C- Estro. D- Diestro. Imuno-histoquímica, objetiva de 20x, barra de 100 $\mu$ m.

#### 4. DISCUSSÃO

Todas as avaliações histomorfométricas apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nas comparações entre as cadelas pré-púberes e em diferentes fases do ciclo estral. As diferenças nas mensurações do endométrio em cadelas pré-púberes e púberes em anestro quando comparadas com cadelas em fase de estro e diestro podem ser explicadas pela intensa hipertrofia celular que ocorre nas fases progesterônicas do ciclo (DE BOSSCHERE; DUCATELLE; TSHAMALA, 2002).

As mensurações do endométrio total das cadelas durante o diestro ( $1359,8 \pm 133,4$ ) estão próximos aos valores obtidos por Gossler et al. (2017), que estudaram a relação da variação dessa espessura com o *status* metabólico de cadelas em diestro, e por Sokolowski, Zimbelman e Goyings (1973), que avaliaram cadelas pré-púberes e em diferentes fases do ciclo estral. Fisiologicamente, ocorre um aumento na espessura endometrial durante a fase do proestro, que se mantém durante o estro e diestro e, essa espessura diminui drasticamente no anestro (SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973).

A utilização da contagem e classificação das células inflamatórias endometriais na cadela ainda foi pouco explorada, tanto para animais saudáveis, quanto para animais com alterações. Apesar de não terem sido detectadas diferenças estatísticas na contagem de células inflamatórias infiltradas em endométrio uterino entre cadelas pré-púberes e nas fases do ciclo estral, foi possível notar menor concentração de linfócitos no endométrio de cadelas no diestro. De acordo com Henriques et al. (2016), as células inflamatórias no endométrio normal de cadelas em diestro é escassa e são representadas por granulócitos, macrófagos e linfócitos, e esse fato também foi observado neste estudo.

Nas outras fases do ciclo e nas pré-púberes, as distribuições das células inflamatórias infiltradas no endométrio canino, representada aqui principalmente pelos linfócitos, foi bem semelhantes, sendo discretamente maior na camada total do endométrio na fase do anestro. Em um estudo com foco na população de linfócitos (T e B) e macrófagos, por imuno-histoquímica, indicou que os linfócitos T estão em maior quantidade no endométrio canino durante a fase do anestro (PIRES, M. A.; PAYAN-CARREIRA, 2015). Diferente do que foi observado neste estudo, os

linfócitos estão mais concentrados no estroma endometrial de porcas na fase de estro (KAEOKET; PERSSON; DALIN, 2001).

Ao conhecimento dos autores, não há trabalhos contendo informações sobre a imunomarcção do endométrio canino de cornos uterinos especificando as diferentes fases do ciclo estral e em animais pré-púberes. As células marcadas no estroma uterino foram compostas por células inflamatórias, especificamente por macrófagos, assim como relatado em outros estudos envolvendo pesquisa de imunomarcção de COX-2 em endométrio (VEIGA et al., 2017). Apesar de neste estudo não serem observadas diferenças estatísticas ( $p > 0,116$  na camada superficial e  $p > 0,08$  na camada total) na contagem de células inflamatórias imunomarcadas no estroma uterino entre cadelas pré-púberes e púberes em diferentes fases do ciclo estral, observou-se quase dez vezes mais células marcadas nas fases do proestro e anestro quando comparadas as fases de estro e diestro, fases que apresentam maior concentração sérica de progestágenos. Em um estudo sobre o efeito dos hormônios ovarianos sobre alterações na resistência imune, observou-se que a expressão de *Interferon gamma* (IFN $\gamma$ ) por células mononucleares de sangue periférico em resposta a um determinado clone de *E. coli* foi significativamente aumentada na presença de estradiol e suprimida na presença de progesterona (SUGIURA et al., 2004). Os macrófagos são ativados na presença do IFN $\gamma$ , e evidências encontradas em macrófagos de útero de camundongos indicam que hormônios esteroidais possam facilitar essa ativação (HUNT; MILLER; PLATT, 1998).

Outros fatores que podem explicar a maior contagem de células imunomarcadas em endométrio de cadelas no anestro, observada neste estudo, são a limpeza e reparação do tecido endometrial uterino que ocorre nesta fase, e conseqüentemente a necessidade de um maior aporte de macrófagos (BARRAU et al., 1975; PIRES, M. A.; PAYAN-CARREIRA, 2015; SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973). Os macrófagos fazem parte dos grupos celulares que produzem a COX-2 em resposta a citocinas pró-inflamatórias (CROFFORD, 1997).

Por fim, os resultados obtidos neste estudo podem ser utilizados como parâmetros para comparação com alterações inflamatórias uterinas que ocorrem na cadela, em qualquer uma das fases do ciclo estral. Mesmo não sendo observadas diferenças estatísticas entre as fases do ciclo, foi possível observar um padrão nas modificações inflamatórias uterinas, tanto nas avaliações da expressão proteica da

COX-2 no endométrio canino quanto na contagem de células inflamatórias endometriais.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer à Professora Carmen Lúcia Scortecchi Hilst por todo suporte na colheita das amostras, aos residentes e pós-graduandos do Laboratório de Patologia Animal (UEL) por todo auxílio prestado durante a análise das amostras, ao técnico de laboratório Giomar de Azevedo e ao mestrando Luiz Guilherme Corsi Trautwein por todo auxílio com o processamento histológico das amostras, ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal pelo suporte financeiro, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

### **REFERÊNCIAS**

BARRAU, M. D.; ABEL, J. H.; VERHAGE, H. G.; TIETZ, W. J. Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch. **Developmental Dynamics**, v. 142, n. 1, p. 47-65, 1975.

BARTEL, C.; TICHY, A.; WALTER, I. Characterization of foamy epithelial surface cells in the canine endometrium. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 43, n. 3, p. 165-181, 2014.

BUDRAS, K.D.; MCCARTHY, P. H.; HOROWITZ, A.; BERG, R.; FRICKE, W.; RICHTER, R. **Anatomy of the Dog**. 5th ed. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co., 2007.

CROFFORD, L. J. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. **The Journal of Rheumatology**. Supplement, v. 49, p. 15-19, 1997.

DALIN, A.-M.; KAEOKET, K.; PERSSON, E. Immune cell infiltration of normal and impaired sow endometrium. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 401-413, 2004.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; TSHAMALA, M. Is mechanically induced cystic endometrial hyperplasia (CEH) a suitable model for study of spontaneously occurring CEH in the uterus of the bitch?. **Reproduction in domestic animals**, v. 37, n. 3, p. 152-157, 2002.

ENGLAND, G. C. W.; BURGESS, C. M.; FREEMAN, S. L. Perturbed sperm–epithelial interaction in bitches with mating-induced endometritis. **The Veterinary Journal**, v. 194, n. 3, p. 314-318, 2012.

ENGLAND, G. C. W.; RUSSO, M.; FREEMAN, S. L. The bitch uterine response to semen deposition and its modification by male accessory gland secretions. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 2, p. 179-184, 2013.

GALABOVA, G.; EGERBACHER, M.; AURICH, J. E.; LEITNER, M.; WALTER, I. Morphological changes of the endometrial epithelium in the bitch during metoestrus and anoestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 5, p. 415-420, 2003.

GOSSLER, V. S. A.; SANTOS, F. A. G.; AZEVEDO, A. R.; GONCALVES, P. C.; RIGOLO, H. A.; TREVISAN, C.; MASSENO, A. P. B.; CARDOSO, A. P. M. M.; PAPA, P. C.; CASTILHO, C.; GIOMETTI, I. C. Evaluation of cell proliferation and endometrial thickness of bitches in different periods of diestrus. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1719-1727, 2017.

GROPPETTI, D.; ARALLA, M.; BRONZO, V.; BOSI, G.; PECILE, A.; ARRIGHI, S. Perioovulatory time in the bitch: what's new to know?: Comparison between ovarian histology and clinical features. **Animal reproduction science**, v. 152, p. 108-116, 2015.

HENRIQUES, S.; SILVA, E.; SILVA, M. F.; CARVALHO, S.; DINIZ, P.; LOPES-DA-COSTA, L.; MATEUS, L. Immunomodulation in the canine endometrium by uteropathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 114, 2016.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2 - 10 years later. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 2, p. 367-375, 2002.

HOLST, B. S.; GUSTAVSSON, M. H.; LILLIEHÖÖK, I.; MORRISON, D.; JOHANNISSON, A. Leucocyte phagocytosis during the luteal phase in bitches. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 153, n. 1, p. 77-82, 2013.

JONES, R. L.; KELLY, R. W.; CRITCHLEY, H. O. Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. **Human Reproduction**, v. 12, n. 6, p. 1300-1306, 1997.

KAEOKET, K.; PERSSON, E.; DALIN, A.-M. The sow endometrium at different stages of the oestrous cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 1, p. 95-114, 2001.

KOWALEWSKI, M. P.; SCHULER, G.; TAUBERT, A.; ENGEL, E.; HOFFMANN, B. Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. **Theriogenology**, v. 66, n. 6, p. 1423-1430, 2006.

LIM, H.; PARIA, B. C.; DAS, S. K.; DINCHUK, J. E.; LANGENBACH, R.; TRZASKOS, J. M.; DEY, S. K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 197-208, 1997.

MARIONS, L.; DANIELSSON, K. G. Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 10, p. 961-965, 1999.

MARSHALL, F. H. A; JOLLY, W. A. Contributions to the physiology of mammalian reproduction. Part I. The oestrous cycle in the dog. Part II. The ovary as an organ of internal secretion. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character**, p. 99-141, 1906.

MITACEK, G.; PRADERIO, R. G.; STORNELLI, M. C.; SOTA, R. L.; STORNELLI, M. A. Prostaglandin synthesis enzymes' gene transcription in bitches with endometritis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. S2, p. 298-302, 2017.

MONTEIRO, C. M. R.; PERRI, S. H. V.; CARVALHO, R. G. D.; KOIVISTO, M. B. Histologia e morfometria em cornos uterinos de cadelas nulíparas, múltíparas e tratadas com contraceptivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 847-851, 2009.

NAVARRO, J. L.; BAGNOLLI, V. R. Antiinflamatórios, prostaglandinas e COX-2: ações e funções no sistema genital e urinário femininos e no processo de reprodução. **Revista Brasileira de Medicina**, p. 59-64, 2001.

PAYAN-CARREIRA, R.; PIRES, M. A.; STRÖM HOLST, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Tumour necrosis factor in the canine endometrium: an immunohistochemical study. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 3, p. 410-418, 2011.

PIRES, M. A.; PAYAN-CARREIRA, R. Resident Macrophages and Lymphocytes in the Canine Endometrium. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 5, p. 740-749, 2015.

PONGLOWHAPAN, S.; CHURCH, D. B.; KHALID, M. Expression of cyclooxygenase-2 in the canine lower urinary tract with regard to the effects of gonadal status and gender. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1276-1288, 2009.

POST, K. Canine vaginal cytology during the estrous cycle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 26, n. 3, p. 101, 1985.

REDDY, K. C. S.; RAJU, K. G. S.; RAO, K. S.; RAO, K. B. R. Vaginal cytology, vaginoscopy and progesterone profile: breeding tools in bitches. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 25, n. 2, p. 51-54, 2011.

REHM, S.; STANISLAUS, D. J.; WILLIAMS, A. M. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 3, p. 233-245, 2007.

SILVA, E.; LEITÃO, S.; FERREIRA-DIAS, G.; LOPES DA COSTA, L.; MATEUS, L. Prostaglandin synthesis genes are differentially transcribed in normal and pyometra endometria of bitches. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. s2, p. 200-203, 2009.

SOKOLOWSKI, J. H.; ZIMBELMAN, R. G.; GOYINGS, L. S. Canine reproduction: reproductive organs and related structures of the nonparous, parous, and postpartum bitch. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 8, p. 1001, 1973.

SUGIURA, K.; NISHIKAWA, M., ISHIGURO, K., TAJIMA, T., INABA, M., TORII, R., HATOYAA, S.; WIJEWARDANAA, V.; KUMAGAIA, D.; TAMADAE, H.; SAWADAE, T.; IKEHARAC, S.; SAWADA, T. Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. **Immunobiology**, v. 209, n. 8, p. 619-627, 2004.

TROEDSSON, M. H. Mating-induced endometritis: physiology or pathology?. **Veterinary Journal**, v. 199, n. 1, p. 9, 2014.

VEIGA, G. A. L.; MIZIARA, R. H.; ANGRIMANI, D. S. R.; PAPA, P. C.; COGLIATI, B.; VANNUCCHI, C. I. Cystic endometrial hyperplasia–pyometra syndrome in bitches: identification of hemodynamic, inflammatory, and cell proliferation changes. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 1, p. 58-69, 2017.

VOORWALD, F. A.; MARCHI, F. A.; VILLACIS, R. A. R.; ALVES, C. E. F.; TONIOLLO, G. H.; AMORIM, R. L.; DRIGO, S. A.; ROGATTO, S. R. Molecular expression profile reveals potential biomarkers and therapeutic targets in canine endometrial lesions. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0133894, 2015.

**6 ARTIGO C**

**IMUNO-HISTOMORFOLOGIA NA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES UTERINAS  
EM CADELAS SUBMETIDAS À OVARIOHISTERECTOMIA ELETIVA**

## IMUNO-HISTOMORFOLOGIA NA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES UTERINAS EM CADELAS SUBMETIDAS À OVARIOHISTERECTOMIA ELETIVA

Rebeca Cordeiro Justino<sup>1</sup>, Elisangela Olegário da Silva<sup>2</sup>, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense<sup>2</sup>, Lucienne Garcia Pretto Giordano<sup>2</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Reproa. Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. \* Autor correspondente: imartins@uel.br

### RESUMO

As alterações uterinas de origem inflamatória podem se apresentar de forma subclínica, se tornando causas de falhas reprodutivas em cadelas. O objetivo deste estudo foi determinar padrões histológicos, morfométricos e imuno-histoquímicos no útero de cadelas pré-púberes e púberes em diferentes fases do ciclo estral, submetidas a ovariohisterectomia eletiva. Foram utilizadas 40 cadelas submetidas à ovariohisterectomia eletiva, com histórico informado pelo tutor. Foram realizados cultura uterina, morfohistologia e escore lesional uterino, morfometria uterina, contagem de células inflamatórias endometriais e imuno-histoquímica para COX-2 dos fragmentos uterinos. A fase do ciclo estral foi identificada por citologia vaginal e histologia ovariana. Os animais com alterações uterinas, identificadas nos exames realizados, foram divididos em três grupos: Hiperplasia endometrial cística (HEC), endometrite, e HEC/ inflamação. A análise estatística foi realizada comparando os grupos de alterações uterinas com cadelas sem alterações uterinas pré-púberes e púberes e, em uma segunda análise, cadelas sem alterações uterinas em diferentes fases do ciclo estral. Metade das cadelas avaliadas apresentou alteração uterina. Foi observada diferença significativa entre as contagens de linfócitos e plasmócitos ( $p < 0,05$ ) presentes na camada superficial do endométrio das cadelas com alterações uterinas inflamatórias e cadelas púberes sem alteração. A imunomarcagem para COX-2 mais acentuada e extensa ocorreu no endométrio de cadelas com maior número de neutrófilos em camada superficial de endométrio, acompanhado de

edema e congestão. Conclui-se que as avaliações da morfometria uterina, contagem de células inflamatórias infiltradas em endométrio uterino e imunomarcagem da COX-2 no endométrio canino se mostraram eficazes no auxílio da identificação de alterações uterinas e na diferenciação entre alterações inflamatórias e não inflamatórias, sendo possível estabelecer um padrão para tais avaliações.

Palavras-chave: Ciclooxigenase, Endometrite, Hiperplasia endometrial cística, Subfertilidade.

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar das modificações histomorfológicas em útero de cadelas híginas estarem bem estabelecidas, ainda há muitas lacunas a serem preenchidas sobre as alterações uterinas, como quais os exames utilizar para o diagnóstico e como interpretar seus resultados (BARRAU et al., 1975; PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015; REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007; SCHLAFER, 2012; SOKOLOWSKI; ZIMBELMAN; GOYINGS, 1973). As alterações uterinas em cadelas e sua influência sobre a fertilidade têm sido alvo de inúmeras pesquisas nesta última década (FONTAINE et al., 2009; ENGLAND; MOXON; FREEMAN, 2012; ENGLAND; RUSSO; FREEMAN, 2013; FREEMAN; GREEN; ENGLAND, 2013; GIFFORD; SCARLETT; SCHLAFER, 2014; SCHLAFER, 2012; MIR et al., 2013).

O uso da histomorfometria para avaliação das alterações causadas pelo uso de anticoncepcionais já foi descrito, assim como estudo da histomorfometria cervical canina durante as fases do ciclo estral e a espessura endometrial canina em diferentes momentos do diestro (AUGSBURGER; KÜRZI, 2004; AYDIN; DOĞAN; TIMURKAAN, 2013; GOSSLER et al., 2017; MONTEIRO et al., 2009; SALINAS; MIGLINO; DEL SOL, 2017). O uso desse exame na avaliação de alterações uterinas, em específico a hiperplasia endometrial cística, foi descrito apenas por De Bosschere et al. (2002).

Devido sua alta incidência, o complexo hiperplasia endometrial cística - piometra é a afecção do trato genital canino mais estudada em cadelas, com pesquisas que vão desde sua fisiopatologia até as mais recentes, de biomarcadores para diagnóstico e prognóstico (SANT'ANNA, 2017; SANT'ANNA et al., 2014; VOORWALD et al., 2015). A discussão referente à classificação desse complexo e

modificações que ocorrem primeiro no endométrio parece não estar finalizada, apesar de ser aceito pela maioria dos pesquisadores que a hiperplasia endometrial cística é a lesão precursora (DE BOSSCHERE et al., 2001; DOW, 1959; PRETZER, 2008; VERSTEGEN; DHALIWAL; VERSTEGEN-ONCLIN, 2008). O complexo apresenta pelo menos duas classificações clássicas, uma relacionada apenas as lesões histomorfológicas (DOW, 1959) e a outra baseada primariamente nas alterações clínicas apresentadas pelo animal (DE BOSSCHERE et al., 2001).

A endometrite, intensamente investigada em humanos e em animais de produção, devido sua interferência na fertilidade (KASIUS et al., 2011; LEBLANC; CAUSEY, 2009; TUMMARUK et al., 2010), na espécie canina tem sido relacionada com subfertilidade e infertilidade, como ausência de concepção e perdas embrionárias (GIFFORD; SCARLETT; SCHLAFER, 2014; MIR et al., 2013). A endometrite induzida pela cópula foi descrita em cadelas, sendo discutido tanto seu aspecto fisiológico quanto patológico (ENGLAND; RUSSO; FREEMAN, 2013; FREEMAN; GREEN; ENGLAND, 2013; TROEDSSON, 2014).

A contagem e classificação de células inflamatórias infiltradas na camada superficial do endométrio são usadas como teste de triagem para endometrite em suínos e equinos, com valores de referência bem estabelecidos (DALIN; KAEOKET; PERSSON, 2004; KAEOKET; PERSSON; DALIN, 2001; MIRAGAYA; WOODS; LOSINNO, 1997; ROGAN et al., 2007; ROONGSITTHICHAI et al., 2011; SEGABINAZZI et al., 2017; TUMMARUK et al., 2010). Em cadelas no diestro, foi proposto por Mitateck et al. (2017) uma contagem específica de células inflamatórias apenas em epitélio superficial do endométrio canino, não sendo porém avaliado o endométrio como um todo.

Em relação ao caráter qualitativo das células inflamatórias infiltradas no endométrio canino nos casos de endometrite, observou-se inicialmente pequena quantidade de neutrófilos, sendo esses substituídos por linfócitos, plasmócitos e macrófagos nos casos mais crônicos, associado ou não a fibrose intersticial leve (SCHLAFER, 2012). Apesar da contagem de células inflamatórias endometriais ser um exame para o auxílio do diagnóstico de afecções uterinas subclínicas, em especial a endometrite, sua interpretação pode ser influenciada por causas fisiológicas, que podem alterar a composição e intensidade do infiltrado inflamatório, como fases do ciclo estral e a inseminação e/ou cópula (ENGLAND; RUSSO; FREEMAN, 2013; PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015).

A enzima ciclooxygenase 2 (prostaglandina H sintetase 2) (COX-2) desempenha um importante papel no trato reprodutor feminino, estando envolvida em respostas inflamatórias fisiológicas e não fisiológicas (KOWALEWSKI et al., 2006; SILVA et al., 2010; VEIGA et al., 2017) e sua expressão estudada no cão em diferentes tecidos, como pele lesionada, trato urinário, trato gastrointestinal, entre outros (HAMAMOTO et al., 2009; PONGLOWHAPAN; CHURCH; KHALID, 2009; WILSON et al. 2004).

Estudos em cadelas com afecções uterinas indicaram que a COX-2 apresenta maior expressão gênica e proteica em casos de piometra, quando comparadas com HEC, mucometra, em diestro e anestro fisiológicos (SILVA et al., 2009; VEIGA et al., 2017; VOORWALD et al., 2015). Em cadelas com endometrite, a expressão gênica da COX-2 foi significativamente maior em cadelas com endometrite aguda quando comparadas com cadelas em diestro e com endometrite crônica (MITACEK et al., 2017).

Embora na literatura disponível haja informações a respeito de modificações uterinas que ocorrem em determinadas afecções nas cadelas, não foram encontrados dados sobre contagem de células inflamatórias endometriais em casos de alterações uterinas e sobre a expressão proteica da COX-2 em casos de endometrites. O objetivo deste estudo foi comparar os achados das avaliações histomorfológica, histomorfométrica, de contagem de células inflamatórias endometriais e da imunomarcação de COX-2 em cadelas com e sem alterações uterinas para possibilitar o melhor entendimento das técnicas disponíveis para fins diagnósticos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Animais e histórico

Foram utilizadas 40 cadelas, de um projeto de controle de natalidade, entre 5 meses e 15 anos, pesando entre 5 a 29 kg, sem raça definida. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética institucional CEUA 28647.2013.53. O histórico das cadelas foi fornecido por seus tutores e variáveis consideradas desconhecidas foram excluídas das análises estatísticas.

As variáveis utilizadas foram faixa etária, histórico de doenças anteriores e tratamentos, puberdade (observação do primeiro cio), histórico de cruza (se cruzou e quantas vezes), de cruzas não seguidas de gestações, de abortamento, de secreção vaginal anormal (se apresentou e qual sua característica), de partos (se ocorreu e quantas vezes) e do uso de anticoncepcional (se usou e quantas vezes).

## 2.2. Exame microbiológico

Após a ovariectomia (OHE), o lúmen uterino foi acessado com o auxílio de uma tesoura. Nas cadelas em que foi observado secreção no lúmen uterino (10/40) foi realizada a fricção leve na mucosa uterina, com o auxílio de um *swab* estéril que foi armazenado em meio de transporte Stuart, mantido em geladeira (4°C) e transportado em caixa refrigerada até o laboratório. Os *swabs* foram semeados em ágar sangue ovino 5% (Himedia®, Mumbai, Índia) e as placas incubadas a 37°C em aerofilia por até 72 horas, para posterior observação de colônias bacterianas.

## 2.3. Exame histológico e morfométrico

Foram colhidos fragmentos (0,5 a 1 cm) da porção média dos cornos uterinos, contendo toda a extensão da parede uterina, e ambos os ovários. Os tecidos foram fixados em solução de formaldeído tamponada à 10% por 12 a 24 horas e, posteriormente, mantidos em álcool 70%. As amostras foram preparadas de acordo com técnicas de histologia clássica, com desidratação, diafanização, inclusão em parafina e secções de aproximadamente 3 µm. Foram montadas três lâminas subsequentes (réplicas): uma lâmina para avaliação morfológica, morfométrica e contagem de células inflamatórias corada por hematoxilina e eosina (HE) e duas outras para avaliação da atividade da COX-2 por imuno-histoquímica.

As mensurações foram efetuadas em cinco campos aleatórios do endométrio, do miométrio e de toda a parede uterina, conforme Monteiro et al. (2009). As fotomicrografias foram realizadas e avaliadas utilizando o programa Motic Images plus 2.0 nas objetivas de 2,5x e 10x.

## 2.4. Classificação das fases do ciclo estral

Na classificação das fases do ciclo estral das cadelas foi levado em consideração o histórico, a citologia vaginal e a histologia ovariana.

Para citologia vaginal, lâminas foram confeccionadas com *swabs* vaginais colhidos com escova ginecológica no pós-operatório imediato, sendo coradas com Giemsa e avaliadas em microscópio de luz (POST, 1985; REDDY et al., 2011). Foram identificadas as proporções das células parabasais, intermediárias e superficiais, presença de leucócitos, hemácias, bactérias e muco.

Para histologia ovariana, levou-se em consideração presença e tamanho de folículos terciários, assim como a luteinização dos mesmos, presença de *corpus hemorrhagicum*, *corpus luteum*, *corpus luteum atrésico* e *corpus albicans* (GROPETTI et al., 2015; PAYAN-CARREIRA et al., 2011; REDDY et al., 2011; POST, 1985; SOKOLOWSKY et al., 1973).

## 2.5. Caracterização das alterações uterinas

Foram primeiramente identificadas de acordo com alterações morfológicas descritas em literatura (DE BOSSCHERE et al., 2001; DOW, 1959; MIR et al., 2013; TUMMARUK et al., 2010; SCHLAFER, 2012). Na HEC foram observadas principalmente presença de hiperplasia glandular endometrial acompanhada de formações glandulares císticas (DE BOSSCHERE et al., 2001). Na piometra, observou-se exsudato inflamatório em luz uterina e infiltrado inflamatório em endométrio, acompanhado ou não de HEC (DE BOSSCHERE et al., 2001; DOW, 1959). A endometrite foi classificada pela presença de edema, congestão, infiltrado inflamatório anormal em estroma endometrial e fibrose intersticial, sendo considerada aguda devido à presença de intenso infiltrado neutrofílico; sub-aguda devido à moderado infiltrado neutrofílico e presença de plasmócitos; e crônica devido intenso infiltrado linfocitário, presença de plasmócitos e poucos neutrófilos (DE BOSSCHERE et al., 2001; MIR et al., 2013; SCHLAFER, 2012; TUMMARUK et al., 2010).

Para a contagem de células inflamatórias endometriais, o estroma endometrial foi dividido em duas camadas: **superficial**, contendo a área do epitélio superficial e a abertura das criptas glandulares, e **basal**, contendo as glândulas

endometriais profundas mais próximas ao miométrio. Para cada corte, o número de células foi contado em quatro campos aleatoriamente selecionados em cada camada, totalizando 8 campos por animal, utilizando para isso um microscópio de luz e objetiva de 40x. A área total mensurada por animal foi de 1.272 mm<sup>2</sup> (159,1mm<sup>2</sup>/campo). A área total mensurada por camada em cada corte foi de 636,4mm<sup>2</sup>. A contagem de células foi estimada pela soma de cada tipo celular por área endometrial avaliada (Adaptado de PIRES; PAYAN-CARREIRA, 2015).

Foi realizado um escore histológico lesional uterino para comparar as alterações histológicas entre os animais e assim, facilitar a discussão entre os diferentes grupos estudados. O escore uterino de cada animal foi obtido por meio da soma dos escores lesionais, os quais foram determinados multiplicando-se o grau de extensão (0-ausente; 1-discreto; 2- moderado; 3-acentuado) pelo fator de severidade dos parâmetros pré-estabelecidos (Tabela 1) (Adaptado de KOLF-CLAUW et al., 2009). O escore máximo total foi estabelecido em 48 pontos.

Tabela 1. Parâmetros estabelecidos e seu respectivo grau de severidade para a avaliação dos cortes uterinos de cadelas clinicamente saudáveis.

<b>Alteração histológica</b>	<b>Grau de severidade (fator de multiplicação)</b>
Congestão	1
Degeneração de células endometriais	1
Edema intersticial	1
Formação cística (endométrio)	2
Hemorragia	2
Hiperplasia glandular (endométrio)	2
Infiltrado inflamatório luminal/ secreção luminal	2
Inflamação inflamatório intersticial	2
Necrose endometrial	3

Fonte: os próprios autores

## 2.7. Exame imuno-histoquímico

Para avaliar a expressão proteica de COX-2 em útero canino foi realizado exame imuno-histoquímico. Fragmentos de 3µm de espessura, em lâminas silanizadas, foram submetidos à recuperação antigênica com solução de citrato de sódio pH 6,0 em panela de pressão. As peroxidases endógenas foram bloqueadas

com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metanol em câmara escura, seguido de bloqueador de proteína (Dako®). Após estas etapas, os fragmentos foram incubados com anticorpo primário anti-cox-2 (clone CX-294, diluição 1:100, Dako®) e, posteriormente, com anticorpo secundário (Nichirei Biosciences ®). Em seguida, foi realizada revelação com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina - Dako®) e contracoloração com hematoxilina. Os controles positivo e negativo foram usados de acordo com as recomendações do fabricante. Procedeu-se a desidratação do material com banhos de álcool e foram montadas com selante e lamínulas.

Para as avaliações, o endométrio foi dividido em três grupos celulares: epitélio luminal, epitélio glandular e células inflamatórias presentes no estroma endometrial (adaptado de VEIGA et al., 2017). Os dois primeiros grupos celulares foram avaliados (epitélio luminal e glandular) em toda a extensão uterina, com auxílio de objetiva de 20x, recebendo dois escores: extensão de 0 a 3 (sendo 0 = ausente, 1 = focal, 2 = multifocal, 3 = difusa) e intensidade de 0 a 3 (sendo 0 = negativo, 1 = fraco, 2 = moderado, 3 = intenso). Para o terceiro grupo celular, foi realizada a contagem das células marcadas, utilizando a mesma metodologia empregada para a contagem de células inflamatórias endometriais, e a avaliação subjetiva da intensidade de 0 a 3 (sendo 0 = negativo, 1 = fraco, 2 = moderado, 3 = intenso) de cada campo avaliado.

## 2.8. Análise estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados pelo programa IBM SPSS Statistics for Windows, versão 20.0/2011 (Armonk, NY: IBM Corp), com nível de significância de 5%.

Para a avaliação dos dados, as cadelas com alterações uterinas foram reagrupadas em três grupos: HEC, endometrite, e HEC/ inflamação. Inicialmente, os resultados obtidos nos testes realizados para esses grupos foram comparados com os das cadelas saudáveis púberes e pré-púberes. Em segunda análise, foram comparados com cadelas saudáveis no diestro e anestro e no proestro e estro.

Foi realizada primeiramente a avaliação de normalidade pelos testes Shapiro-Wilks e Kolmogorov-Smirnov e, após constatação de grupos de variáveis paramétricas e não paramétricas, foram realizados testes específicos para cada conjunto de variáveis. Para variáveis não paramétricas que possuíam até duas

categorias foi utilizado o Mann-Whitney bilateral. Para variáveis não paramétricas que possuíam 3 ou mais categorias foi realizado o Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney bilateral para comparação a cada 2 grupos. Para variáveis paramétricas que possuíam até duas categorias foi utilizado o teste t. Para variáveis paramétricas que possuíam 3 ou mais categorias foi realizado o ANOVA seguido do teste t para comparação a cada 2 grupos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Histórico e exame microbiológico

Na avaliação dos históricos, foi constatado um caso de abortamento e três cadelas com secreção vaginal purulenta. Dentre os três animais com histórico de secreção vaginal, apenas uma das cadelas apresentou alteração nas avaliações uterinas (endometrite subaguda). Também houve dois relatos de doenças anteriores (uma parvovirose e uma otite), sendo uma delas tratada com antibiótico poucos dias antes da OHE.

A colheita de *swab* uterino foi realizada em 10 animais, sendo que todas as culturas bacterianas foram negativas. Entretanto, das 10 cadelas avaliadas, seis apresentaram alguma alteração uterina, sendo quatro endometrites, uma piometra/HEC e uma HEC.

#### 3.2. Exame histológico e alterações uterinas

Com base na avaliação microscópica uterina, 50% (20/40) das cadelas foram diagnosticadas com algum tipo de alteração uterina, entre elas: endometrite crônica (25%; 10/40), hiperplasia endometrial cística (20%; 8/40), endometrite sub-aguda (7,5%; 3/40), piometra (2,5%; 1/40) e endometrite aguda (2,5%; 1/40). Importante salientar que alguns animais apresentaram alterações concomitantes (Figura 1). A contagem de células inflamatórias da camada superficial se mostrou mais intensa em animais com afecções endometriais mais severas (Figura 2).

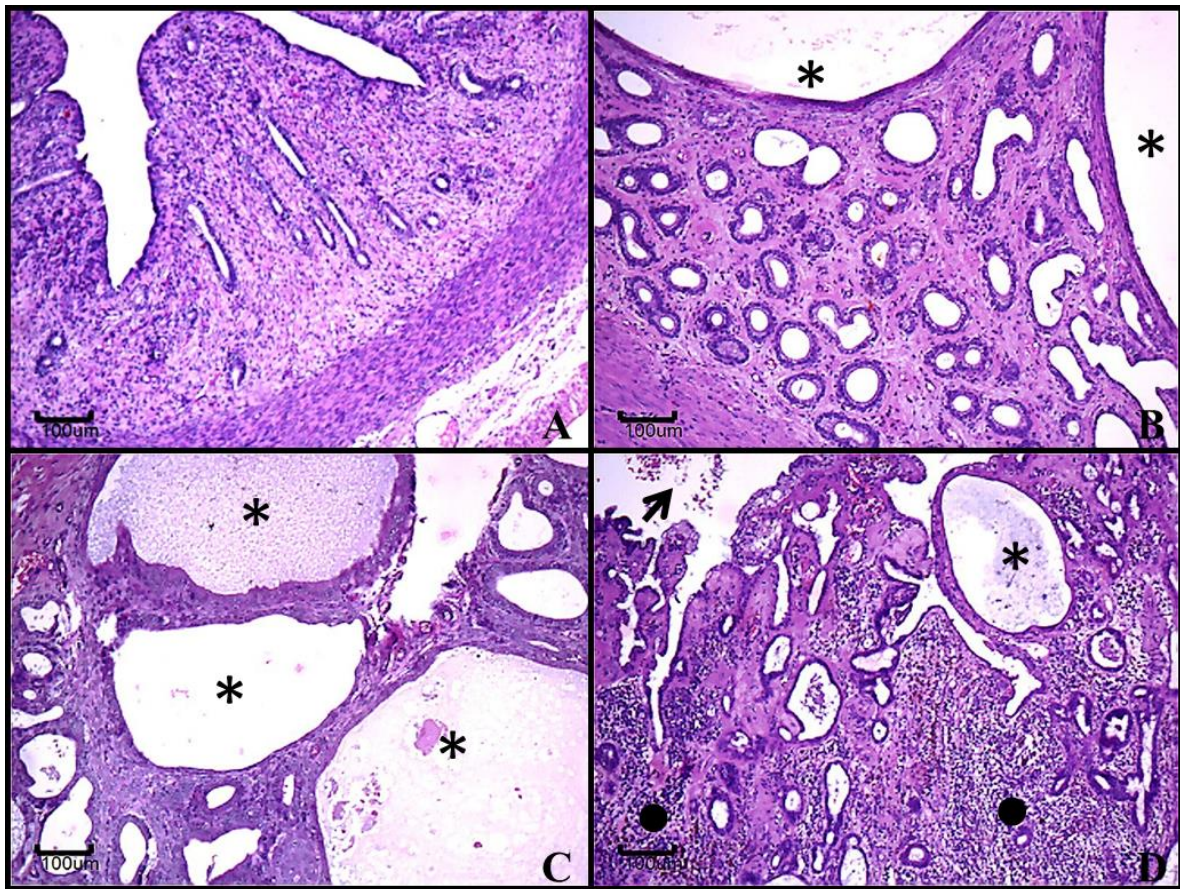


Figura 1. Alterações histológicas em úteros de cadelas submetidas a ovariectomia eletiva. A- Útero normal. B- Endométrio com moderada hiperplasia glandular e formações císticas (\*). C- Endométrio com formações císticas, com ou sem presença de material secretório amorfo (\*). D- Endométrio com acentuado infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos e plasmócitos) (●), formação cística (\*), degeneração e necrose epitelial superficial e presença de debris celulares e células inflamatórias no lúmen uterino (seta). Coloração H&E, objetiva de 2,5x, barra de 100 µm.

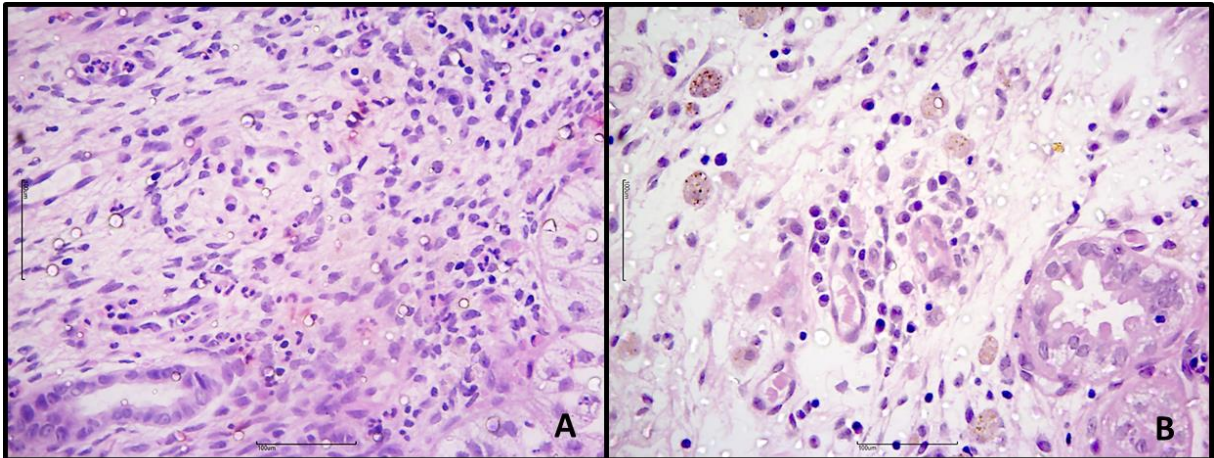


Figura 2. Infiltrado inflamatório anormal em endométrio canino. A- Infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico em animal portador de endometrite aguda. B- Infiltrado inflamatório misto, com predominância de plasmócitos em animal portador de endometrite sub-aguda. Coloração H&E, objetiva de 40x, barra de 100 $\mu$ m.

### 3.3. Exame imuno-histoquímico

Apenas 5% (2/40) das cadelas apresentaram imunomarcção moderada e multifocal em epitélio luminal, sendo uma portadora de endometrite aguda e uma de HEC e endometrite crônica (Figura 3). Um animal (2,5%) apresentou imunomarcção acentuada e difusa no epitélio luminal, e acentuada e multifocal em epitélio glandular, sendo acometido por piometra e HEC (Figura 4).

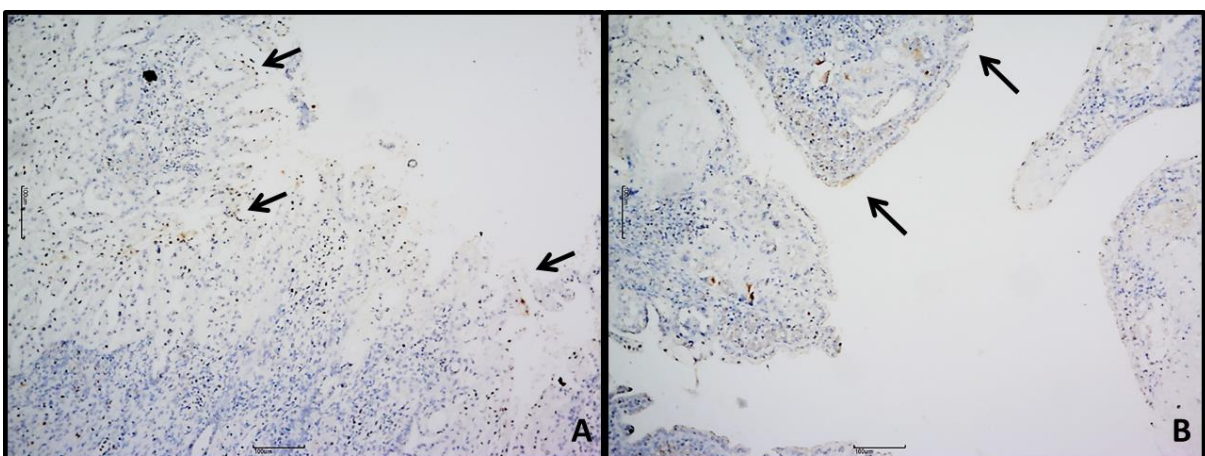


Figura 3. Imunomarcção de COX-2 de endométrio uterino de cadelas submetidas a castração eletiva. A- Animal portador de endometrite aguda. B- Animal portador de Hiperplasia endometrial cística e endometrite crônica. Em ambos os casos é possível observar imunomarcção positiva moderada e multifocal em epitélio luminal. Imuno-histoquímica, objetiva de 10x, barra de 100 $\mu$ m.

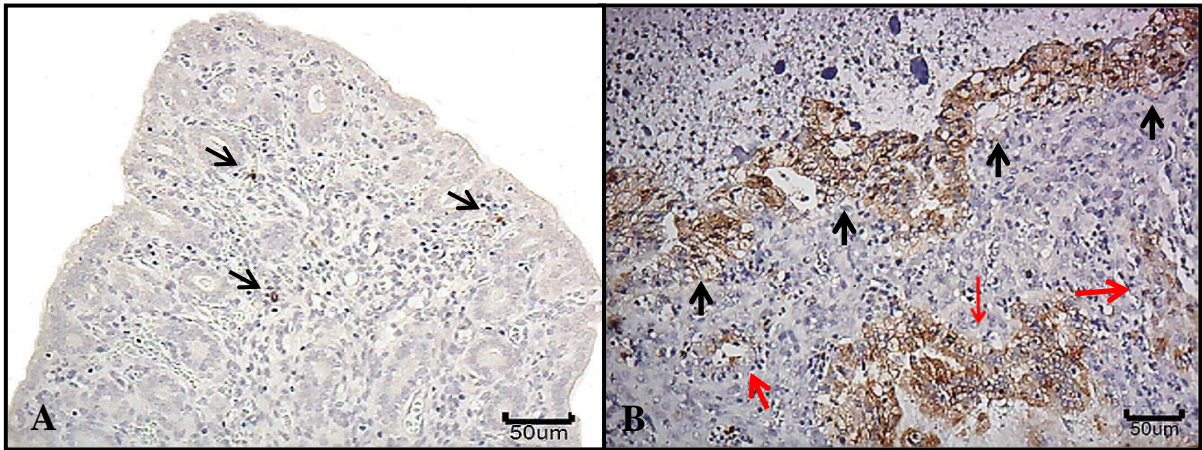


Figura 4. Imunomarcção de COX-2 em endométrio uterino de cadelas. A- Útero sem presença de alterações patológicas significativas evidenciando ausência de marcação por COX-2 em epitélio luminal e glandular. Observa-se marcação positiva apenas em macrófagos (setas). B- Útero com presença de piometra no qual se observa imunomarcção positiva para COX-2 em epitélio luminal (setas pretas) e glandular (setas vermelhas). Imuno-histoquímica, objetiva de 10 e 20x, barra de 50µm

### 3.4. Grupos e análise estatística

Para as avaliações estatísticas e melhor exposição dos dados, os animais foram reagrupados em HEC (4/40), endometrite (11/40) e HEC/inflamação (4/40). As distribuições dessas alterações uterinas dentro de cada variável presente nas fases do ciclo estral e no histórico das cadelas estão descritas na Tabela 2 e 3.

Tabela 2. Distribuições das alterações uterinas (endometrite, HEC e HEC com endometrite) e animais sem alterações, diagnosticadas pela histomorfologia nas fases do ciclo estral de cadelas submetidas à ovariectomia eletiva.

Variável	Alteração uterina			Animais sem afecção
	HEC	Endometrite	HEC/Inflamação	
Pré-púbere (5/40)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/40)	100% (5/5)
Proestro (6/40)	0% (0/6)	16,7% (1/6)	0% (0/6)	83,3% (5/6)
Estro (3/40)	33,3% (1/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	66,7% (2/3)
Diestro (7/40)	0% (0/7)	42,9% (3/7)	14,3% (1/7)	42,9% (3/7)
Anestro (19/40)	15,8% (3/19)	36,8% (7/19)	15,8% (3/19)	31,6% (6/19)
Total	10,0% (4/40)	27,5% (11/40)	10,0% (4/40)	52,5% (21/40)

HEC = hiperplasia endometrial cística.

Tabela 3. Distribuições das alterações uterinas: endometrite, HEC e HEC com endometrite, diagnosticadas pela histomorfologia em cadelas submetidas à ovariectomia eletiva em diferentes grupos de variáveis presentes no histórico geral e reprodutivo.

Variável	Alteração uterina*			Animais sem alteração
	HEC	Endometrite	HEC/Inflamação	
<b>Faixa etária</b>				
<1 ano (10/37)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	100% (10/10)
1-6 anos (22/37)	13,6% (3/22)	36,4% (8/22)	13,6% (3/22)	36,4% (8/22)
> 6 anos (5/37)	20,0% (1/5)	20,0% (1/5)	0% (0/5)	60,0% (3/5)
Total*	10,8% (4/37)	24,3% (9/37)	8,1% (3/37)	56,7% (21/37)
<b>Puberdade</b>				
Não (5/40)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	100% (5/5)
Sim (35/40)	11,4% (4/35)	31,4% (11/35)	11,4% (4/35)	45,7% (16/35)
Total*	10,0% (4/40)	27,5% (11/40)	10,0% (4/40)	52,5% (21/40)
<b>Histórico de cópula</b>				
Não (18/37)	11,1% (2/18)	11,1% (2/18)	5,5% (1/18)	72,2% (13/18)
Sim (19/37)	5,3% (1/19)	42,1% (8/19)	10,5% (2/19)	42,1% (8/19)
Total*	8,1% (3/37)	27,0% (10/37)	8,1% (3/37)	56,7% (21/37)
<b>Cópula x Gestação</b>				
Não (7/19)	14,3% (1/7)	71,4% (5/7)	0% (0/7)	14,3% (1/7)
Sim (12/19)	0% (0/12)	25,0% (3/12)	16,7% (2/12)	58,3% (7/12)
Total*	5,3% (1/19)	42,1% (8/19)	10,5% (2/19)	42,1% (8/19)
<b>Anticoncepcional</b>				
Não usou (18/34)	0% (0/18)	27,8% (5/18)	0% (0/18)	72,2% (13/18)
1 vez (4/34)	50,0% (2/4)	0% (0/4)	25,0% (1/4)	25,0% (1/4)
2 vezes (5/34)	0% (0/5)	0% (0/5)	20,0% (1/5)	80,0% (4/5)
≥ 3 vezes (7/34)	14,3% (1/7)	57,1% (4/7)	0% (0/7)	28,6% (2/7)
Total*	8,8% (3/34)	26,5% (9/34)	5,9% (2/34)	58,8% (20/34)
<b>Número de partos</b>				
Nulípara (21/35)	14,3% (3/21)	19,0% (4/21)	4,8% (1/21)	61,9% (13/21)
Primípara (5/35)	0% (0/5)	60,0% (3/5)	0% (0/5)	40,0% (2/5)
Múltípara (9/35)	0% (0/9)	33,3% (3/9)	0% (0/9)	66,7% (6/9)
Total*	8,6% (3/35)	28,6% (10/35)	2,9% (1/35)	60,0% (21/35)

\* Os valores não somam o n total das afecções, pois não foram consideradas nas variáveis sem resposta

Os resultados encontrados nos animais portadores de alterações uterinas na histomorfologia ainda foram comparados com diferentes grupos de animais sem alterações. Primeiro foram usados como controle animais púberes e pré-púberes sem alteração. Os valores referentes às avaliações morfométricas, contagem de células inflamatórias da camada superficial do endométrio, a contagem e intensidade das células imunomarcadas positivamente para COX-2 e o escore lesional endometrial, assim como a análise das variáveis, estão descritos nas Tabelas 4 a 6.

Tabela 4. Medianas (mín - máx) e médias ( $\pm$  desvio padrão) referentes às avaliações histomorfométricas uterinas de cadelas pré-púberes e púberes, submetidas à ovariectomia eletiva, com e sem alterações uterinas diagnosticadas na histomorfologia, e respectivos p-valores das suas comparações.

Cadelas	Endométrio ( $\mu\text{m}$ )	Camada muscular ( $\mu\text{m}$ )	Parede uterina ( $\mu\text{m}$ )
	M( $\pm$ DV)	MD (Mín - Máx)	M( $\pm$ DV)
Sem afecção P (16/40)	1128,7( $\pm$ 344,3) <sup>a</sup>	1184,3(495,5-2547,1) <sup>a</sup>	2380,4( $\pm$ 932,7) <sup>a</sup>
Sem afecção PP (5/40)	795,0( $\pm$ 220,8) <sup>a</sup>	506,5(346,0-792,1) <sup>b</sup>	1431,5( $\pm$ 485,7) <sup>b</sup>
HEC (4/40)	1751,3( $\pm$ 218,0) <sup>b</sup>	2285,5(1021,9-2824,4) <sup>a</sup>	3577,0( $\pm$ 893,1) <sup>c</sup>
Endometrite (11/40)	1034,2( $\pm$ 524,9) <sup>a</sup>	1430,5(638,5-2900,0) <sup>a</sup>	2499,2( $\pm$ 1116,9) <sup>abc</sup>
HEC/Inflamação (4/40)	877,4( $\pm$ 252,5) <sup>a</sup>	1310,8(1085,4-2413,0) <sup>a</sup>	2438,8( $\pm$ 778,6) <sup>ac</sup>
p-valor	0,007	0,018	0,034

M = média, DV = desvio padrão, MD = mediana, HEC = hiperplasia endometrial cística, P = púberes, PP = pré-púbere. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância ( $p < 0,05$ ).

Tabela 5. Medianas (mín - máx) referentes aos valores da contagem de células inflamatórias endometriais na camada superficial, de cadelas pré-púberes e púberes, submetidas à ovariectomia eletiva, com e sem alterações uterinas diagnosticadas na histomorfologia, e os respectivos p-valores das suas comparações.

Cadelas	Contagem de células inflamatórias endometriais		
	Camada superficial		
	Linfócitos	Plasmócitos	Neutrófilos
	MD (Mín - Máx)	MD (Mín - Máx)	MD (Mín - Máx)
Sem afecção P (16/40)	62 (27-95) <sup>a</sup>	0 (0-4) <sup>a</sup>	0 (0-16) <sup>a</sup>
Sem afecção PP (5/40)	70 (39-118) <sup>a</sup>	0 (0-0) <sup>a</sup>	1 (0-3) <sup>ab</sup>
HEC (4/40)	65 (54-81) <sup>a</sup>	0 (0-0) <sup>a</sup>	3 (1-35) <sup>b</sup>
Endometrite (11/40)	276 (78-819) <sup>b</sup>	15 (0-769) <sup>b</sup>	2 (0-627) <sup>b</sup>
HEC/Inflamação (4/40)	222 (105-452) <sup>b</sup>	54 (1-166) <sup>b</sup>	15 (0-509) <sup>b</sup>
p-valor	<0,001	<0,001	0,047

MD = mediana, HEC = hiperplasia endometrial cística, P = púberes, PP = pré-púberes. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância ( $p < 0,05$ ).

Tabela 6. Medianas (mín - máx) referentes aos valores da contagem de células estromais imunomarcadas pela COX-2 e intensidade de marcação dessas células, e média ( $\pm$  desvio padrão) referente ao escore lesional de cadelas pré-púberes e púberes, submetidas à ovariectomia eletiva, com e sem alterações uterinas diagnosticadas na histomorfologia, e os respectivos p-valores das suas comparações.

Cadelas	Imunomarcção COX-2 endometrial		Escore lesional
	CCECS	Intensidade	
	MD (Mín-Máx)	MD (Mín-Máx)	M( $\pm$ DV)
Sem afecção P (16/40)	19 (0-80)	1 (0-3)	9,7 ( $\pm$ 3,1)a
Sem afecção PP (5/40)	28(16-43)	1 (1-3)	9,8 ( $\pm$ 4,6)ab
HEC (4/40)	4 (1-20)	0 (0-1)	14,5 ( $\pm$ 1,3)bc
Endometrite (11/40)	16 (1-186)	1 (0-2)	14,1 ( $\pm$ 3,9)b
HEC e Inflamação (4/40)	69 (25-151)	1 (1-3)	19,5 ( $\pm$ 5,1)c
p-valor	0,106	0,647	0,0002

M = média, DV = desvio padrão, MD = mediana, HEC = hiperplasia endometrial cística, P = púberes, PP = pré-púberes, CCECS = contagem de células estromais da camada superficial. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância ( $p < 0,05$ ).

Na segunda análise, onde foram usados como controle animais sem alteração em diestro e anestro e animais em proestro e estro, os resultados estão descritos nas Tabelas 7 a 9.

Tabela 7. Medianas (mín - máx) e médias ( $\pm$  desvio padrão) referentes às avaliações histomorfométricas uterinas em cadelas submetidas à ovariectomia eletiva em diferentes fases do ciclo estral, com e sem alterações uterinas diagnosticadas na histomorfologia, e respectivos p-valores das suas comparações.

Cadelas	Endométrio ( $\mu$ m)	Camada muscular	Parede uterina
		( $\mu$ m)	( $\mu$ m)
	M( $\pm$ DV)	MD (Mín - Máx)	M( $\pm$ DV)
Sem afecção DA (9/40)	1062,0( $\pm$ 314,5) <sup>a</sup>	1249,8(495,5-2547,1)	2602,5( $\pm$ 1038,1)
Sem afecção PE (7/40)	1214,4( $\pm$ 386,3) <sup>a</sup>	1082,4(567,8-1573,3)	2095,0( $\pm$ 754,1)
HEC (4/40)	1751,3( $\pm$ 218,0) <sup>b</sup>	2285,5(1021,9-2824,4)	3577,0( $\pm$ 893,1)
Endometrite (11/40)	1034,2( $\pm$ 524,9) <sup>a</sup>	1430,5(638,5-2900,0)	2499,2( $\pm$ 1116,9)
HEC/Inflamação (4/40)	877,4( $\pm$ 252,5) <sup>a</sup>	1310,8(1085,4-2413,0)	2438,8( $\pm$ 778,6)
p-valor	0,029	0,304	0,226

M = média, DV = desvio padrão, MD = mediana, HEC = hiperplasia endometrial cística, PE = proestro e estro, DA = diestro e anestro. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância ( $p < 0,05$ ).

Tabela 8. Medianas (mín - máx) referentes aos valores da contagem de células inflamatórias endometriais na camada superficial, de cadelas submetidas à ovariectomia eletiva em diferentes fases do ciclo estral, com e sem alterações uterinas diagnosticadas na histomorfologia, e os respectivos p-valores das suas comparações.

Cadelas	Contagem de células inflamatórias endometriais		
	Camada superficial		
	Linfócitos	Plasmócitos	Neutrófilos
	MD (Mín - Máx)	MD (Mín - Máx)	MD (Mín - Máx)
Sem afecção DA (9/40)	57(27-95) <sup>a</sup>	0(0-4) <sup>a</sup>	0(0-16)
Sem afecção PE (7/40)	71(59-81) <sup>a</sup>	0(0-4) <sup>a</sup>	0(0-13)
HEC (4/40)	65 (54-81) <sup>a</sup>	0 (0-0) <sup>a</sup>	3 (1-35)
Endometrite (11/40)	276 (78-819) <sup>b</sup>	15 (0-769) <sup>b</sup>	2 (0-627)
HEC/Inflamação (4/40)	222 (105-452) <sup>b</sup>	54 (1-166) <sup>b</sup>	15 (0-509)
p-valor	<0,001	0,001	0,055

MD = mediana, HEC = hiperplasia endometrial cística, PE = proestro e estro, DA = diestro e anestro. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância ( $p < 0,05$ ).

Tabela 9. Medianas (mín - máx) referentes aos valores da contagem de células estromais imunomarcadas pela COX-2 e intensidade de marcação dessas células, e média ( $\pm$  desvio padrão) referente ao escore lesional de cadelas submetidas à ovariectomia eletiva em diferentes fases do ciclo estral, com e sem alterações uterinas diagnosticadas na histomorfologia, e os respectivos p-valores das suas comparações.

Cadelas	Imunomarcção COX-2 endometrial		Escore lesional
	CCECS	Intensidade	
	MD (Mín-Máx)	MD (Mín-Máx)	M( $\pm$ DV)
Sem afecção DA (9/40)	25(0-55)	1(0-3)	10,7( $\pm$ 3,3) <sup>ab</sup>
Sem afecção PE (7/40)	5(0-80)	1(0-3)	8,4( $\pm$ 2,4) <sup>a</sup>
HEC (4/40)	4 (1-20)	0 (0-1)	14,5 ( $\pm$ 1,3) <sup>cd</sup>
Endometrite (11/40)	16 (1-186)	1 (0-2)	14,1 ( $\pm$ 3,9) <sup>bc</sup>
HEC e Inflamação (4/40)	69 (25-151)	1 (1-3)	19,5 ( $\pm$ 5,1) <sup>d</sup>
p-valor	0,143	0,626	<0,001

M = média, DV = desvio padrão, MD = mediana, HEC = hiperplasia endometrial cística, PE = proestro e estro, DA = diestro e anestro, CCECS = contagem de células estromais da camada superficial. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância ( $p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Não foi observado crescimento bacteriano nas culturas realizadas em aerofilia de *swabs* uterinos provenientes das cadelas que apresentaram secreção uterina (10/40), mesmo nas que apresentaram alteração uterina de caráter inflamatório. Alguns dos resultados negativos da cultura bacteriana observados neste estudo podem ser decorrentes da presença de inflamação não acompanhada de infecção ou de casos iniciais de mucometra. Alguns estudos realizados com cadelas clinicamente diagnosticadas com piometra também relataram resultados negativos em cultura em aerofilia e em anaerobiose (DHALIWAL; WRAY; NOAKES, 1998; SANT'ANNA et al., 2014).

De acordo com Dhaliwal, Wray e Noakes (1998), os resultados negativos podem ser decorrentes do sucesso dos mecanismos de defesa uterina na eliminação das bactérias inicialmente envolvidas na patogênese da doença. Olson e Mather (1978) relataram 96,1% (25/26) de negatividade em culturas uterinas quando avaliadas cadelas híginas submetidas a OHE eletiva. Em outro estudo, cujo objetivo foi o estabelecimento da microbiota normal no útero de cadelas, foram observadas culturas negativas em um caso de supuração em corno uterino e tuba uterina, um caso de HEC e endometrite e um caso de endometrite crônica, indicando que é possível observar essas alterações inflamatórias não acompanhadas por infecção (SCHULTHEISS et al., 1999).

A frequência de alterações uterinas diagnosticadas neste estudo foi de 50% (20/40). Quando se observa os achados em animais com histórico de problemas de fertilidade, nota-se um aumento na incidência dessas alterações. Neste estudo, das cadelas que apresentaram histórico de cópula, 36,8% (7/19) também possuíam histórico de falha gestacional e abortamento. Todas apresentaram algum tipo de alteração uterina, sendo 71,4% (5/7) diagnosticadas com endometrite e 14,3% (1/7) diagnosticada com HEC. Gifford, Scarlett e Schlafer (2014) encontraram frequências mais altas de HEC (33,3%; 133/399) e endometrite (42,6%; 170/399) em biópsias uterinas de cadelas com histórico de subfertilidade. Em levantamento de cadelas com histórico de ausência de concepção e perda embrionária precoce, observaram-se alterações em biópsias uterinas em 80,5% (17/21) dos casos, com uma frequência de 33,3% tanto para endometrites (7/21) quanto para alterações uterinas hiperplásicas císticas (7/21) (MIR et al., 2013).

As frequências identificadas neste estudo corroboram com os resultados de estudos que observaram a interferência de alterações como HEC e a endometrite na interação dos espermatozóides com o útero canino (ENGLAND; MOXON; FREEMAN, 2012; FREEMAN; GREEN; ENGLAND, 2013).

Foram observadas diferenças entre as espessuras endometriais obtidas dos animais portadores de HEC e animais pré-púberes e púberes sem alterações nas avaliações histomorfológicas, assim como os animais sem alterações em diferentes fases do ciclo estral ( $p < 0,05$ ). As cadelas com HEC também apresentaram a maior espessura da camada muscular circular e maior espessura total da parede uterina, sendo diferente dos animais pré-púberes e púberes sem alteração ( $p < 0,05$ ). Essa variação pode ser explicada pelo aumento encontrado na expressão dos receptores de estrógeno e progesterona em parede uterina de animais portadores de HEC quando comparados com animais sem alteração (DHALIWAL; ENGLAND; NOAKES, 1999; DE BOSSCHERE et al., 2002); como o estrógeno está relacionado à proliferação celular, e ocorre um aumento na proliferação nos casos de HEC, credita-se ser esta explicação da maior espessura da parede uterina nestes casos (COOKE et al., 2013; REUSCHE et al., 2018).

De Bosschere, Ducatelle e Tshamala (2002) apresentaram dados comparando a espessura endometrial e miometrial total de cadelas em anestro e diestro sem alterações uterinas com cadelas portadoras de HEC induzida por fio de seda, sendo a espessura endometrial deste último grupo estatisticamente maior que os animais saudáveis em anestro.

Foi possível observar que as menores espessuras endometriais estão presentes em animais portadores de endometrite ( $877,4 \mu\text{m} \pm 252,5$ ), acompanhada ou não de HEC ( $1034,2 \mu\text{m} \pm 524,9$ ) e dos sete animais com histórico de cópula não seguida de gestação, cinco apresentaram essa afecção. A espessura endometrial já foi relacionada a problemas na reprodução assistida em humanos, os quais, mulheres com maior espessura endometrial apresentaram maior índice de gestação e nascidos vivos (RICHTER et al., 2007).

Neste estudo foi observado aumento das contagens de linfócitos e plasmócitos ( $p < 0,05$ ) presentes na camada superficial do endométrio dos animais com alterações uterinas inflamatórias quando comparados com animais púberes e em diferentes fases do ciclo estral sem alteração, indicando que o uso da contagem

das células inflamatórias presentes no endométrio é uma útil ferramenta para a identificação de alterações inflamatórias em cadelas, como a endometrite.

De acordo com Dalin et al. (2004), a diferenciação das modificações fisiológicas das alterações pode estar na compreensão da infiltração de células inflamatórias no endométrio. Valores altos de neutrófilos na contagem de células inflamatórias da camada superficial do endométrio foram observados nos casos de endometrite aguda, sub-aguda e no caso de piometra. Esses valores para inflamações agudas são compatíveis com o diagnóstico da endometrite em éguas, pela contagem de células inflamatórias em biópsias endometriais, que é baseado no achado de mais de 17 polimorfonucleares em cada campo do *stratum compactum*, avaliado em aumento de 400x (MIRAGAYA; WOODS; LOSINNO, 1997; SEGABINAZZI et al., 2017). Entretanto, nos casos de endometrite crônica se observou um intenso aumento nas contagens de linfócitos e plasmócitos. Essa mudança na composição das células presentes no infiltrado inflamatório é descrita por Schlafer (2012), sendo uma alteração característica da transição da inflamação aguda para crônica.

Na pesquisa da imunomarcção da COX-2 no endométrio das cadelas, apesar de não terem sido observadas diferenças estatísticas entre a contagem de células presentes no estroma endometrial da camada superficial das cadelas portadoras ou não de alterações uterinas, foi possível observar que a contagem se apresentou duas vezes maior nas cadelas com HEC e inflamação, quando comparada com as cadelas sem alterações. Em estudo de imuno-histoquímica para pesquisa de marcação de COX-2 em endométrio de cornos uterinos e cadelas com alterações uterinas, como piometra e HEC, e em cadelas na fase de diestro, onde foi demonstrado maior contagem de células imunomarcadas em estroma endometrial em cadelas com piometra (VEIGA et al., 2017). Tanto a menor severidade das alterações uterinas, como a ausência de contaminação bacteriana, confirmada por cultura negativa, podem explicar a menor imuno-marcação encontrada neste estudo quando comparado aos resultados observados por Veiga et al. (2017).

Neste experimento, as cadelas com alterações inflamatórias agudas apresentaram maior intensidade e extensão na imunomarcção da COX-2 em epitélio luminal e glandular. Veiga et al. (2017) observaram maior intensidade e extensão de marcação apenas em epitélio luminal endometrial para animais com piometra. Essa disparidade não parece ter um impacto clínico, e sim ser proveniente

do baixo número de animais com infecção aguda observadas neste experimento (3/40). Em um estudo realizado com 24 porcas, foi observada diferença significativa entre a imunomarcção de animais saudáveis e com endometrite crônica quando comparados com animais portadores de endometrite aguda (ROONGSITTHICHAJ et al., 2011).

A maior expressão gênica e imunomarcção mais extensa e intensa em casos de infecção aguda são explicadas pelo fato que a produção de COX-2 é intensamente estimulada por imunomediadores produzidos pela inflamação /infecção uterina (HENRIQUES et al., 2016; SILVA et al., 2010; VOORWALD et al., 2015). A expressão gênica relacionada a síntese da COX-2 já foi explorada para cadelas saudáveis em diestro e anestro e cadelas portadoras de alterações uterinas como piometra, HEC e endometrite, e foram observadas diferenças significativas entre cadelas com piometra e cadelas sem sinais de inflamação (MITACEK et al., 2017; SILVA et al., 2009; VOORWALD et al., 2015). A relação do aumento da produção de prostaglandinas e, por dedução, o aumento de uma das enzimas responsáveis por essa produção (COX-2) foram relatados em cadelas com piometra (HAGMAN et al., 2006), corroborando mais uma vez os resultados obtidos por este estudo.

Com base nesses resultados é possível concluir que as avaliações morfométricas, em específico a espessura endometrial, a contagem de células inflamatórias infiltradas em endométrio uterino e a marcação do endométrio canino pela técnica de imuno-histoquímica para COX-2 se mostraram eficazes no auxílio do diagnóstico de alterações uterinas e na diferenciação entre alterações inflamatórias e não inflamatórias.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer à Professora Carmen Lúcia Scortecci Hilst por todo suporte na colheita das amostras, aos funcionários, residentes e pós-graduandos do Laboratório de Patologia Animal (UEL) por todo auxílio prestado durante o processamento e análise das amostras, ao técnico de laboratório Giomar de Azevedo e ao mestrando Luiz Guilherme Corsi Trautwein por todo auxílio com o processamento histológico das amostras, ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal pelo suporte financeiro, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.



## REFERÊNCIAS

AUGSBURGER, H. R.; KÜRZI, M. Histomorphologic and morphometric evaluation of the uterine horns in nulliparous and multiparous beagles. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 5, p. 552-558, 2004.

AYDIN, M.; DOĞAN, H.; TIMURKAAN, S. Changes in the histomorphology of the canine cervix, ovary and steroid hormone levels through the oestrous cycle. **Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences**, v. 3, n. 10, p. 343 - 347, 2013.

BARRAU, M. D.; ABEL, J. H.; VERHAGE, H. G.; TIETZ, W. J. Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch. **Developmental Dynamics**, v. 142, n. 1, p. 47-65, 1975.

COOKE, P. S.; SPENCER, T. E.; BARTOL, F. F.; HAYASHI, K. Uterine glands: development, function and experimental model systems. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 19, n. 9, p. 547-558, 2013.

DALIN, A.-M.; KAEOKET, K.; PERSSON, E. Immune cell infiltration of normal and impaired sow endometrium. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 401-413, 2004.

DHALIWAL, G. K.; ENGLAND, G. C.; NOAKES, D. E. Oestrogen and progesterone receptors in the uterine wall of bitches with cystic endometrial hyperplasia/pyometra. **The veterinary record**, v. 145, n. 16, p. 455-457, 1999.

DHALIWAL, G. K.; WRAY, C.; NOAKES, D. E. Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra). **The Veterinary Record**, v. 143, n. 24, p. 659-661, 1998.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; TSHAMALA, M. Is mechanically induced cystic endometrial hyperplasia (CEH) a suitable model for study of spontaneously occurring CEH in the uterus of the bitch?. **Reproduction in domestic animals**, v. 37, n. 3, p. 152-157, 2002.

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**, v. 70, n. 3-4, p. 251-259, 2002.

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**, v. 55, n. 7, p. 1509-1519, 2001.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 69, p. 237IN17-250IN18, 1959.

ENGLAND, G. C. W.; MOXON, R.; FREEMAN, S. L. Delayed uterine fluid clearance and reduced uterine perfusion in bitches with endometrial hyperplasia and clinical management with postmating antibiotic. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1611-1617, 2012.

ENGLAND, G. C. W.; RUSSO, M.; FREEMAN, S. L. The bitch uterine response to semen deposition and its modification by male accessory gland secretions. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 2, p. 179-184, 2013.

FREEMAN, S. L.; GREEN, M. J.; ENGLAND, G. C. W. Uterine fluid from bitches with mating-induced endometritis reduces the attachment of spermatozoa to the uterine epithelium. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 1, p. 76-80, 2013.

FONTAINE, E.; LEVY, X.; GRELLET, A.; LUC, A.; BERNEX, F.; BOULOUIS, H. J.; FONTBONNE, A. Diagnosis of endometritis in the bitch: a new approach. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, n. 2, p. 196-199, Jul. 2009.

GIFFORD, A. T.; SCARLETT, J. M.; SCHLAFER, D. H. Histopathologic findings in uterine biopsy samples from subfertile bitches: 399 cases (1990–2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 2, p. 180-186, 2014.

GOSSLER, V. S. A.; SANTOS, F. A. G.; AZEVEDO, A. R.; GONCALVES, P. C.; RIGOLO, H. A.; TREVISAN, C.; MASSENO, A. P. B.; CARDOSO, A. P. M. M.; PAPA, P. C.; CASTILHO, C.; GIOMETTI, I. C. Evaluation of cell proliferation and endometrial thickness of bitches in different periods of diestrus. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1719-1727, 2017.

GROPPELTI, D.; ARALLA, M.; BRONZO, V.; BOSI, G.; PECILE, A.; ARRIGHI, S. Perioovulatory time in the bitch: what's new to know?: Comparison between ovarian histology and clinical features. **Animal Reproduction Science**, v. 152, p. 108-116, 2015.

HAGMAN, R. KINDAHL, H.; FRANSSON, B. A.; BERGSTRÖM, A.; HOLST, B. S.; LAGERSTEDT, A. S. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F<sub>2α</sub> metabolite analysis. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 198-206, 2006.

HAMAMOTO, T. YABUKI, A.; YAMATO, O.; FUJIKI, M.; MISUMI, K.; MATSUMOTO, M. Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 induction during wound healing in dog skin. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 3, p. 349-354, 2009.

HENRIQUES, S.; SILVA, E.; SILVA, M. F.; CARVALHO, S.; DINIZ, P.; LOPES-DA-COSTA, L.; MATEUS, L. Immunomodulation in the canine endometrium by uteropathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 114, 2016.

KAEOKET, K.; PERSSON, E.; DALIN, A.-M. The sow endometrium at different stages of the oestrous cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 1, p. 95-114, 2001.

KASIUS, J. C.; FATEMI, H. M.; BOURGAIN, C.; SIE-GO, D. M.; EIJKEMANS, R. J.; FAUSER, B. C.; DEVROEY, P.; BROEKMANS, F. J. The impact of chronic endometritis on reproductive outcome. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 6, p. 1451-1456, 2011.

KEMPISTY, B.; BUKOWSKA, D.; WOZNA, M.; PIOTROWSKA, H.; JACKOWSKA, M.; ZURAW, A.; CIESIOLKA, S.; ANTOSIK, P.; MARYNIAK, H.; OCIEPA, E.; POROWSKI, SZ.; BRUSSOW, K. P.; JASKOWSKI, J. M.; NOWICKI, M. Endometritis and pyometra in bitches: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 6, p. 289 -297, 2013.

KOLF-CLAUW, M.; CASTELLOTE, J.; JOLY, B.; BOURGES-ABELLA, N.; RAYMOND-LETRON, I.; PINTON, P.; OSWALD, I. P. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: Histopathological analysis. **Toxicology In Vitro**, v. 23, n. 8, p. 1580-1584, 2009.

KOWALEWSKI, M. P.; SCHULER, G.; TAUBERT, A.; ENGEL, E.; HOFFMANN, B. Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. **Theriogenology**, v. 66, n. 6, p. 1423-1430, 2006.

LEBLANC, M. M.; CAUSEY, R. C. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, n. s3, p. 10-22, 2009.

MIRAGAYA, M. H.; WOODS, G. L.; LOSINNO, L. Endometritis, salpingitis and fertilisation rates after mating mares with a history of intrauterine luminal fluid accumulation. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. S25, p. 109-112, 1997.

MIR, F.; FONTAINE, E.; ALBARIC, O.; GREER, M.; VANNIER, F.; SCHLAFER, D. H.; FONTBONNE, A. Findings in uterine biopsies obtained by laparotomy from bitches with unexplained infertility or pregnancy loss: an observational study. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 312-322, 2013.

MITACEK, G.; PRADERIO, R. G.; STORNELLI, M. C.; SOTA, R. L.; STORNELLI, M. A. Prostaglandin synthesis enzymes' gene transcription in bitches with endometritis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. S2, p. 298-302, 2017.

MONTEIRO, C. M. R.; PERRI, S. H. V.; CARVALHO, R. G. D.; KOIVISTO, M. B. Histologia e morfometria em cornos uterinos de cadelas nulíparas, múltíparas e tratadas com contraceptivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 847-851, 2009.

OLSON, P. N.; MATHER, E. C. Canine vaginal and uterine bacterial flora. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 6, p. 708-711, 1978.

OTA, H.; IGARASHI, S.; SASAKI, M.; TANAKA, T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. **Human Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 561-566, 2001.

- PAYAN-CARREIRA, R.; PIRES, M. A.; STRÖM HOLST, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Tumour necrosis factor in the canine endometrium: an immunohistochemical study. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 3, p. 410-418, 2011.
- PIRES, M. A.; PAYAN-CARREIRA, R. Resident Macrophages and Lymphocytes in the Canine Endometrium. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 5, p. 740-749, 2015.
- PONGLOWHAPAN, S.; CHURCH, D. B.; KHALID, M. Expression of cyclooxygenase-2 in the canine lower urinary tract with regard to the effects of gonadal status and gender. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1276-1288, 2009.
- POST, K. Canine vaginal cytology during the estrous cycle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 26, n. 3, p. 101 - 104, 1985.
- PRETZER, S. D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: a review. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 359-363, 2008.
- PREVIATO, P. F. G.; NETO, A. P.; WERNER, P. R.; ACCO, A.; MOTA, M. F.; DA SILVA, A. V.; FONSECA, J. F. Alterações morfológicas nos órgãos genitais de cães e gatos provenientes de Vilas Rurais da região de Umuarama, PR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 8, n. 2, p. 105-110, 2005.
- REDDY, K. C. S.; RAJU, K. G. S.; RAO, K. S.; RAO, K. B. R. Vaginal cytology, vaginoscopy and progesterone profile: breeding tools in bitches. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 25, n. 2, p. 51-54, 2011.
- REHM, S.; STANISLAUS, D. J.; WILLIAMS, A. M. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 3, p. 233-245, 2007.
- REUSCHE, N. BEINEKE, A.; URHAUSEN, C.; BEYERBACH, M.; SCHMICKE, M.; KRAMER, S.; GÜNZEL-APEL, A. R. Proliferative and apoptotic changes in the healthy canine endometrium and in cystic endometrial hyperplasia. **Theriogenology**, v. 114, p. 14-24, 2018.
- RICHTER, K. S.; BUGGE, K. R.; BROMER, J. G.; LEVY, M. J. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 1, p. 53-59, 2007.
- ROGAN, D.; FUMUSO, E.; RODRIGUEZ, E.; WADE, J.; BRUNI, S. S. Use of a mycobacterial cell wall extract (MCWE) in susceptible mares to clear experimentally induced endometritis with *Streptococcus zooepidemicus*. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 3, p. 112-117, 2007.

ROONGSITTHICHAJ, A.; SRISUWATANASAGUL, S.; KOONJAENAK, S.; TUMMARUK, P. Expression of cyclooxygenase-2 in the endometrium of gilts with different stages of endometritis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 11, p. 1425-1431, 2011.

SALINAS, P.; MIGLINO, M. A.; DEL SOL, M. Histomorphometrics and quantitative unbiased stereology in canine uteri treated with medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v. 95, p. 105-112, 2017.

SANT'ANNA, M. C. **Proteômica urinária como método de identificação de biomarcadores de lesão renal precoce em cadelas com piometra**. 2017. 82f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

SANT'ANNA, M. C.; GIORDANO, L. G. P.; FLAIBAN, K. K. M. C.; MULLER, E. E.; MARTINS, M. I. M. Prognostic markers of canine pyometra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1711-1717, 2014.

SCHLAFER, D. H. Diseases of the canine uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s6, p. 318-322, 2012.

SCHULTHEISS, P. C.; JONES, R. L.; KESEL, M. L.; OLSON, P. N. Normal bacterial flora in canine and feline uteri. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 560-562, 1999.

SEGABINAZZI, L. G.; FRISO, A. M.; CORREAL, S. B.; CRESPILO, A. M.; DELL'AQUA JR, J. A.; MIRÓ, J.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. **Theriogenology**, v. 104, p. 120-126, 2017.

SILVA, E.; LEITÃO, S.; FERREIRA-DIAS, G.; LOPES DA COSTA, L.; MATEUS, L. Prostaglandin synthesis genes are differentially transcribed in normal and pyometra endometria of bitches. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. s2, p. 200-203, 2009.

SILVA, E.; LEITÃO, S.; HENRIQUES, S.; KOWALEWSKI, M. P.; HOFFMANN, B.; FERREIRA-DIAS, G.; COSTA L. L.; MATEUS, L. Gene transcription of TLR2, TLR4, LPS ligands and prostaglandin synthesis enzymes are up-regulated in canine uteri with cystic endometrial hyperplasia–pyometra complex. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 84, n. 1, p. 66-74, 2010.

SOKOLOWSKI, J. H.; ZIMBELMAN, R. G.; GOYINGS, L. S. Canine reproduction: reproductive organs and related structures of the nonparous, parous, and postpartum bitch. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 8, p. 1001, 1973.

TROEDSSON, M. H. Mating-induced endometritis: physiology or pathology?. **Veterinary journal**, v. 199, n. 1, p. 9, 2014.

TUMMARUK, P.; KESDANGSAKONWUT, S.; PRAPASARAKUL, N.; KAEOKET, K. Endometritis in gilts: reproductive data, bacterial culture, histopathology, and infiltration of immune cells in the endometrium. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 6, p. 575-584, 2010.

VEIGA, G. A. L.; MIZIARA, R. H.; ANGRIMANI, D. S. R.; PAPA, P. C.; COGLIATI, B.; VANNUCCHI, C. I. Cystic endometrial hyperplasia–pyometra syndrome in bitches: identification of hemodynamic, inflammatory, and cell proliferation changes. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 1, p. 58-69, 2017.

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**, v. 70, n. 3, p. 364-374, 2008.

VILÉS, K.; RABANAL, R.; RODRÍGUEZ-PRADO, M.; MIRÓ, J. Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen–thawed semen. **Animal Reproduction Science**, v. 143, n. 1, p. 57-63, 2013.

VOORWALD, F. A.; MARCHI, F. A.; VILLACIS, R. A. R.; ALVES, C. E. F.; TONIOLO, G. H.; AMORIM, R. L.; DRIGO, S. A.; ROGATTO, S. R. Molecular expression profile reveals potential biomarkers and therapeutic targets in canine endometrial lesions. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0133894, 2015.

WILSON, J. E.; CHANDRASEKHARAN, N. V.; WESTOVER, K. D.; EAGER, K. B.; SIMMONS, D. L. Determination of expression of cyclooxygenase-1 and-2 isozymes in canine tissues and their differential sensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **American journal of veterinary research**, v. 65, n. 6, p. 810-818, 2004.

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

O estabelecimento de fatores de risco é interessante para a previsão da ocorrência de afecções infectocontagiosas e um meio para determinar ações preventivas. Neste trabalho não foi possível determinar esses fatores para as infecções causadas pela *Brucella canis* e pelo Herpesvirus canino, devido a total negatividade das amostras e pela não associação observada nas avaliações de *Odds ratio*, respectivamente.

Com as técnicas empregadas para auxiliar a histomorfologia no diagnóstico de afecções uterinas em cadelas, foi possível observar relações entre a maior contagem de células inflamatórias endometriais e maior extensão e intensidade na imunomarcagem da ciclooxygenase 2 no endométrio canino nos animais portadores de afecções uterinas inflamatórias. Também foram observadas diferenças na mensuração do endométrio total de cadelas sem afecções uterinas e cadelas com afecções uterinas proliferativas (hiperplasia endometrial cística).

O diagnóstico de afecções uterinas em cadelas sem sinais clínicos, submetidas à castração eletiva se torna complexo quando não há o conhecimento prévio das modificações fisiológicas que ocorrem nesse órgão durante as fases do ciclo estral. Com os resultados obtidos neste estudo, foi possível estabelecer os valores da contagem de células inflamatórias endometriais em cadelas saudáveis em diferentes fases do ciclo estral.

Com esses achados é possível concluir que os exames empregados foram eficazes tanto para determinar valores de normalidade como para o diagnóstico e diferenciação das alterações uterinas.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### Certificado do Comitê de Ética



Universidade  
Estadual de Londrina

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 008/2013

Londrina, 20 de Fevereiro de 2014.

Prezada Professora,

A CEUA/UEL reunida em 11 de Dezembro de 2013 avaliou o protocolo de projeto de pesquisa intitulado "**Ferramentas para o diagnóstico de infertilidade canina: discutindo causas inflamatórias e genéticas**" processo CEUA nº 28647.2013.53, do Clínica Médica de grandes animais do Centro de Ciências Agrárias desenvolvida sob sua responsabilidade. Esclarecidas as pendências solicitadas, o protocolo de pesquisa foi **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 65 cães fêmeas sem linhagem e idade de 2 a 10 e peso aproximado 5 a 15kg. Os animais, já com restrição hídrica e alimentar por 8 horas, serão admitidos 2 horas antes da cirurgia, mantidos em jaulas individuais e após a recuperação anestésicas serão re-encaminhados aos seus proprietários. O objetivo é estabelecer relações entre as alterações inflamatórias uterinas, as mutações cromossômicas e o histórico de sub-fertilidade ou infertilidade em cadelas. O projeto esta previsto para ser executado em 42 meses após a aprovação da CEUA-UEL.

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo de aula prática aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me. Cordialmente,

*Waldiceu Esp. Verrri Junior*

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrri Junior  
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

**Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins**

Coordenadora do Projeto

Departamento de Clínicas Veterinárias

Com copia para Sra Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Diretor(a) do Hospital Veterinário e Diretor(a) do Centro de Ciências Agrárias

**ANEXO B****Certificado da correção do inglês Artigo 1**

AMERICAN JOURNAL EXPERTS

**EDITORIAL CERTIFICATE**

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

**Manuscript title:****HERPESVIRUS TYPE I AND BRUCELLA CANIS IN A GROUP OF HEALTH BITCHES****Authors:****Maria Isabel M Martins****Date Issued:****October 15, 2017****Certificate Verification Key:****AC13-83B1-9485-9DC6-2109**

This certificate may be verified at [www.aje.com/certificate](http://www.aje.com/certificate). This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at [support@aje.com](mailto:support@aje.com).

*American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit [www.aje.com](http://www.aje.com).*