

## Imunoistoquímica de útero e cérvix de cadelas com diagnóstico de piometra

[Immunohistochemical of the cervix and uterus of bitches diagnosed with pyometra]

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

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP-Botucatu)

### RESUMO

Analisou-se a piometra de 31 cadelas, de raças e idades variadas, sendo 25 cadelas com piometra de cérvix aberta e seis de cérvix fechada. Após ovariossalpingo-histerectomia, foram coletados fragmentos da cérvix e do útero para a avaliação imunoistoquímica. Foram analisados os receptores de estrógenos  $\alpha$  e  $\beta$ , progesterona e colágenos I e III. Foram realizadas imunomarcações em diferentes regiões da cérvix, como o epitélio glandular, o epitélio luminal e o estroma glandular, assim como em diferentes regiões do útero, como o epitélio glandular e o estroma glandular. As imunomarcações de colágenos I e III foram realizadas nas regiões glandular e muscular da cérvix e do útero. Concentrações de receptores de progesterona foram maiores em cadelas com piometra fechada.

Palavras-chave: cadela, imunoistoquímica, piometra

### ABSTRACT

*The pyometra in 31 bitches of different breeds and ages, 25 with pyometra cervix open and 6 closed cervix was analyzed. After the ovari hysterectomy procedure, samples were collected from the cervix and uterus to evaluate immunohistochemistry. For immunohistochemical evaluation estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , progesterone and collagen I and III were analyzed. Immunostainings were performed in different regions of the cervix such as glandular epithelium, luminal epithelium and glandular stroma, as well as in different regions of the uterus, such as glandular epithelium and glandular stroma. The immunostainings for collagen I and III were performed in muscular and glandular regions of the cervix and uterus. The concentration the progesterone receptors were elevated in bitches from the closed pyometra.*

*Keywords: bitches, immunohistochemistry, pyometra*

### INTRODUÇÃO

A piometra é caracterizada pela inflamação do útero com acúmulo de exsudato, a qual ocorre na fase lútea do ciclo estral (Coggan *et al.*, 2004; Smith, 2006). No diestro ocorre uma hipertrofia/hiperplasia do endométrio, estimulada pela progesterona e, subsequentemente, uma invasão bacteriana (Weiss *et al.*, 2004). Trata-se de uma das enfermidades mais comuns do trato genital das fêmeas caninas (Pretzer, 2008; Goericke-Pesch *et al.*, 2010). Segundo Hagman *et al.* (2011), os fatores de risco podem variar entre as raças, e a gestação é considerada um fator protetor.

A patogênese da piometra canina não é completamente esclarecida, mesmo após décadas de estudo. O conceito de Síndrome Hiperplásica Endometrial Cística /Piometra, introduzido por Dow (1957; 1958), sugere que mudanças hormonais provocam a hiperplasia endometrial cística (HEC) e torna o útero mais susceptível à infecção secundária. Mais recentemente, De Bossechere *et al.* (2001) sugeriram que, devido às diferenças clínicas e histopatológicas, a HEC e a piometra devem ser classificadas separadamente. É comum a piometra ser definida como um complexo endometrite/HEC/piometra (Arora *et al.*, 2006).

---

Recebido em 7 de julho de 2011

Aceito em 20 de julho de 2012

E-mail: rodrigo.volpato@hotmail.com

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

A piometra pode ser de forma aberta ou fechada, caracterizada pela presença ou ausência de corrimento vaginal, respectivamente. A cérvix é considerada uma barreira física prevenindo a infecção ascendente pela secreção de muco e constrição; a abertura ou o fechamento da cérvix são ciclo dependentes, e os mecanismos de dilatação cervical nas cadelas não são totalmente esclarecidos (Chatdarong *et al.*, 2008).

A piometra tem sido associada a repetidas e prolongadas respostas ao estrógeno durante o estro, seguida por longos intervalos de dominância da progesterona (Smith, 2006; Pretzer, 2008). O endométrio sob o estímulo da progesterona se hipertrofia devido a um aumento no número e no tamanho de suas glândulas, que aumentam suas atividades secretoras, e um fluido estéril pode se acumular no lúmen do útero. Essas respostas às ações hormonais podem ser mais exacerbadas com o uso de progestágeno exógeno (de Bosschere *et al.*, 2001; Ragni, 2005; Pretzer, 2008).

Sob a influência estrogênica, a cérvix se abre, o que permite a entrada de bactérias (Oliveira, 2007; Oliveira *et al.*, 2008). A patência da cérvix é regulada pela musculatura lisa, pelo tecido fibroso e pela elastina. A remodelação da matriz extracelular tem um papel importante na dilatação cervical pela degradação do colágeno. Em trabalho realizado por Chatdarong *et al.* (2010), foi postulado que o útero de cadelas cíclicas tem maior proporção de colágeno comparado à proporção de musculatura lisa, levando à diminuição da resistência à tração e causando, assim, o relaxamento da cérvix. Resultado semelhante foi observado nas cadelas com piometra de cérvix aberta, sugerindo que a abertura é associada a um aumento na proporção de colágenos frente a fibras musculares (Chatdarong *et al.*, 2010).

Anticorpos monoclonais para receptores de estrógenos humanos foram utilizados para detectar a presença de receptores de estrógeno no útero de cadelas normais e com HEC. Como resultado, obteve-se uma diferença importante, um maior número de receptores em cadelas com HEC, já que os estrógenos são os responsáveis pela proliferação das glândulas do endométrio uterino (de Bosschere *et al.*, 2002a; de Bosschere *et al.*, 2003, Ververidis *et al.*, 2004).

De Bosschere *et al.* (2002b) avaliaram, por ensaio imunistoquímico, a expressão de receptores de estrógeno (REs) e receptores de progesterona (RP4) no útero de cadelas normais, com piometra e com HEC. As contagens de RE e RP4 foram mais elevadas nos animais com HEC, sendo que a menor contagem foi verificada em cadelas com piometra. As diferenças na expressão de receptores sugerem fatores distintos na patogênese de ambas as entidades. Assim, pode-se pensar que a piometra é desencadeada por uma cascata de eventos iniciada pela infecção bacteriana.

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

## MATERIAL E MÉTODOS

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

Foram utilizadas 31 cadelas com diagnóstico de piometra atendidas na área de reprodução de pequenos animais. Do total de cadelas, 25 apresentavam secreção vaginal purulenta, mucopurulenta ou sanguinolenta, e seis piometra de cérvix fechada. Após o procedimento de ovariossalpingo-histerectomia (OSH), foram

coletados fragmentos da cérvix e do útero para a avaliação imunoistoquímica.

Os fragmentos uterinos e cervicais foram fixados em formol tamponado 10% durante 24 horas e, depois, mantidos em álcool 70% até o momento de inclusão em parafina. Após a inclusão, cortes de 3µm foram obtidos, montados em lâminas e corados inicialmente em HE para avaliar a qualidade do material. Posteriormente novos cortes de 3µm foram realizados e colocados em lâminas com extremidade fosca, previamente tratadas com Poly-L-lysina (Poly-L-lysine® – Sigma Chemical Co., USA).

Para a desparafinização do material embocado, as lâminas foram mantidas em estufa a 55°C por 24 horas, após o que foram colocadas em cuba de vidro com xilol à temperatura ambiente por 30 minutos e, a seguir, em nova solução de xilol por 20 minutos. As lâminas foram transferidas para a hidratação em banhos de álcool, permanecendo por três minutos em cada cuba (álcool absoluto I, II, III, álcool 95% e 85%). Posteriormente, as lâminas foram submetidas a 10 passagens de água destilada. A partir desta etapa, o tratamento se difere para cada antígeno pesquisado.

Para a detecção de RE $\alpha$ , realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10mM (1000mL de água destilada e 2,1g de ácido cítrico mono-hidratado, com pH corrigido para 6,0 com ácido clorídrico) com incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako, USA). A etapa seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite em pó Molico® 3g/100mL por 60 minutos, seguidas de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4 (Trizma Base®–Sigma Chemical Co, USA). Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:50 (anticorpo Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor  $\alpha$  clone 1D5 - Dako – CA, USA, Cód M7047), em câmara úmida, durante 18h, à temperatura de 4°C.

Para a detecção de RE $\beta$ , realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10mM com incubação em micro-ondas, potência máxima – 750W, durante 15 minutos. A etapa seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por

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

Para a detecção de RP4, realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato de sódio 10mM com incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako, USA). A etapa seguinte foi o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 8% por 20 minutos, 10 lavagens em água destilada, bloqueio com leite Molico® 3g/100mL por 60 minutos, seguidas de 10 passagens em água destilada e lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4. Realizou-se a incubação com o anticorpo primário, na diluição de 1:50 (anticorpo monoclonal cat. No 1546, Immunotech, France), em câmara úmida, durante 18h, à temperatura de 4°C.

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

As próximas etapas foram semelhantes para todos os antígenos. Após 18 horas de incubação com o anticorpo primário em câmara úmida a 4°C, o material foi, então, submetido a banhos de TRIS e, posteriormente, incubado com o anticorpo secundário Advance (Advance, Dako, USA) por 30 minutos cada etapa, segundo instruções do fabricante. Realizou-se nova lavagem com solução tampão TRIS – pH 7,4 e

revelação com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina - Liquid DAB Cromogen® - Dako, USA), durante cinco minutos, e novamente lavagem com solução tampão TRIS - pH 7,4.

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

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

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

Para os RE $\alpha$ , RE $\beta$  e RP4, os tecidos avaliados na cérvix foram o epitélio luminal, o epitélio glandular e o estroma. No útero, os tecidos avaliados foram o epitélio glandular e o estroma. Todas as avaliações para o útero e a cérvix foram realizadas nestes tecidos. Para avaliar a imunomarcagem, foram utilizados dois métodos; no primeiro, em cada um desses tecidos, foram contados 300 núcleos, sendo considerados positivos aqueles corados em marrom, e negativos aqueles corados em azul; no segundo método, a intensidade das marcações foi avaliada, de forma subjetiva, em fraca, moderada e forte. As avaliações foram realizadas em um microscópio de luz com aumento de 400 vezes.

Para os colágenos I e III, a mesma forma de avaliação foi empregada para o útero e a cérvix.

Dois métodos foram utilizados para avaliar a imunomarcagem. No primeiro, dez campos aleatórios, nos tecidos muscular e estroma, eram observados em microscópio de luz com aumento de 100 vezes. Cada campo recebia escore de 1 (menos de 25% do campo corado de marrom), 2 (26% a 50%), 3 (51% a 75%) ou 4 (acima de 75%). A média dos campos foi realizada calculando-se o escore definitivo daquela lâmina. No segundo método, a intensidade foi classificada, de forma subjetiva, como fraca (menos de 20% das fibras coradas), moderada (26% a 75%) e forte (acima de 76%).

Para comparar os resultados entre os grupos de piometra aberta e piometra fechada, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados foram avaliados considerando-se  $P < 0,05$ . A frequência das intensidades dos núcleos positivos (fraco, moderado e forte) entre as regiões teciduais estudadas foi comparada pelos testes qui-quadrado e exato de Fisher. Nos casos em que houve associação significativa, realizou-se a partição da tabela qui-quadrado, em que se comparam as frequências entre os locais estudados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação imunoistoquímica empregada neste trabalho foi capaz de marcar os núcleos das células que possuíam receptores. Por ser uma técnica semiquantitativa, a presença e a intensidade da marcação refletem, respectivamente, a positividade da célula e a concentração destes receptores. As duas variáveis podem ser utilizadas. Em alguns trabalhos, os autores avaliaram o número de núcleos positivos e sua intensidade (Boos *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2008; Martin, 2009); em outros, os pesquisadores avaliaram apenas a intensidade da marcação (Robinson *et al.*, 2001), ou, ainda, apenas a identificação foi realizada (Breeveld-Dwarkasing *et al.*, 2002). Neste estudo, optou-se pela realização das duas avaliações.

Neste experimento, foram realizados exames imunoistoquímicos para a identificação e a quantificação de colágenos I e III (Fig.1) e dos RE $\alpha$  e RE $\beta$ , RP4 (Fig.2) em diferentes regiões do útero e da cérvix.

*Imunoistoquímica de útero...*

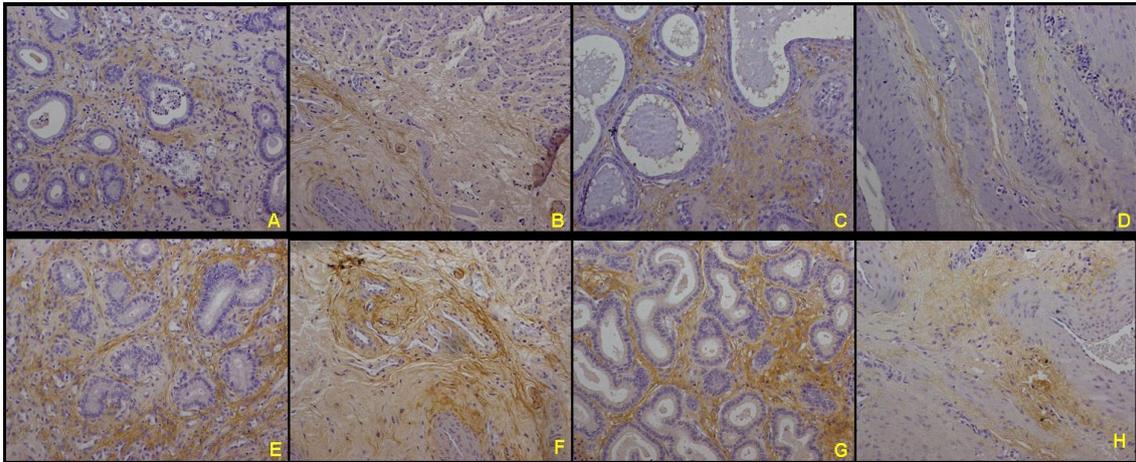


Figura 1. Imunomarcção em cadelas, representada na coloração marrom, aumento de 200X, para colágeno I, sendo “A” região estroma da cérvix, “B” região muscular da cérvix, “C” região glandular do útero, “D” região muscular do útero e colágeno III, “E” região estroma da cérvix, “F” região muscular da cérvix, “G” região glandular do útero e “H” região muscular do útero. Imunoistoquímica, DAB, contra- coloração hematoxilina de Harris.

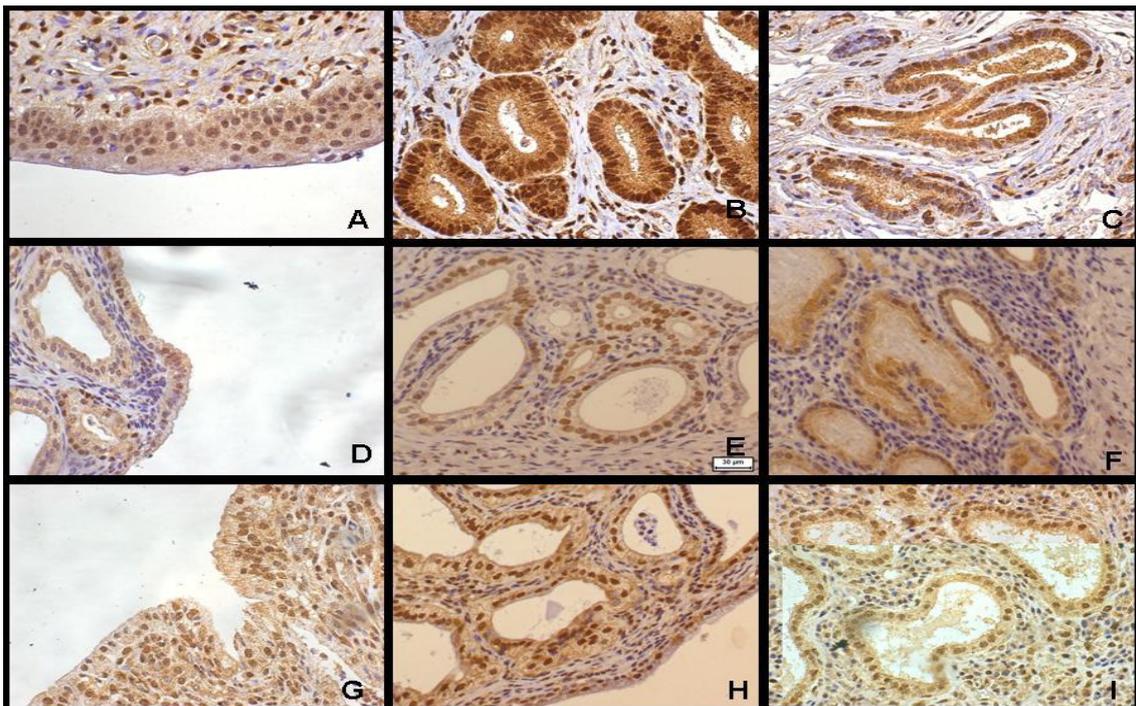


Figura 2. Detecção imunoistoquímica em cadelas, sendo considerados núcleos positivos aqueles corados em marrom, e negativos aqueles corados em azul. “A” receptores de progesterona no epitélio luminal da cérvix, aumento 400X, “B” receptores de progesterona no epitélio glandular e estroma da cérvix, “C” receptores de progesterona no epitélio glandular e estroma do útero, “D” receptores de estrógeno  $\alpha$  no epitélio luminal da cérvix, “E” receptores de estrógeno  $\alpha$  no epitélio glandular e estroma da cérvix, “F” receptores de estrógeno  $\alpha$  no epitélio glandular e estroma do útero, “G” receptores de estrógeno  $\beta$  no epitélio luminal da cérvix, “H” receptores de estrógeno  $\beta$  no epitélio glandular e estroma da cérvix, “I” receptores de estrógeno  $\beta$  no epitélio glandular e estroma do útero, aumento 200X. Imunoistoquímica, DAB, contracoloração hematoxilina de Harris.

Estudos sobre receptores hormonais em útero de cadelas já foram realizados. Segundo Kunkitti *et al.* (2011), os REs e RP4 controlam a abertura e o fechamento cervical durante o ciclo estral; infelizmente o mecanismo envolvido, as mudanças e as associações bioquímicas que ocorrem nesse processo não são totalmente conhecidos.

A concentração dos RE $\alpha$  não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados. A identificação e a quantificação de RE $\alpha$  também não apresentaram diferenças em nenhuma das regiões avaliadas no útero e na cérvice quando se comparam os grupos de piometra aberta e fechada.

A avaliação imunoistoquímica dos RE $\beta$  não apresentou diferença significativa quando se avaliaram o número de núcleos positivos e a intensidade de marcação entre os grupos piometra aberta e fechada, e nem entre as diferentes regiões do útero e da cérvice.

Aumento nas concentrações de estrógenos plasmáticos provoca um aumento no número dos REs e RP4s, já a diminuição nas concentrações desses receptores está relacionada com um aumento nas concentrações plasmáticas de progesterona (Galabova-Kovacs *et al.*, 2003). Enquanto nos animais normais há uma diminuição nos REs sob a influência de progesterona (P4), esse mecanismo parece ser falho nas cadelas com HEC-piometra (de Cock *et al.*, 1997).

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

Quando se comparou a imunorreatividade dos RE $\alpha$  entre as diferentes regiões do útero, observou-se que o epitélio glandular foi corado com intensidade mais forte do que o estroma, determinando concentração maior de RE $\alpha$  nessa região. Também na cérvice o epitélio glandular foi corado mais intensamente quando comparado com o estroma e o epitélio luminal. Levando em consideração que a concentração de receptores é diretamente proporcional à intensidade da marcação, a região com o maior número de RE $\alpha$  no útero e na cérvice é o epitélio glandular. Os resultados diferem dos observados por Dhaliwal *et al.* (1999) que encontraram escore muito baixo para RE e RP4 no epitélio glandular do útero.

Em relação à identificação dos RP4s, não houve diferença significativa entre os grupos de piometra aberta e fechada, entretanto houve diferença significativa na concentração de RP4s entre os grupos piometra aberta e fechada quando se consideraram as diversas regiões do útero. A imunorreatividade foi maior no epitélio glandular do útero, nas piometras fechadas. Em geral é aceito que os E2 induzem à proliferação das glândulas endometriais e que a P4 induz ao aumento da atividade secretora, sendo também responsável pelo início da fase secretória. Neste contexto, pode-se inferir que a produção de muco é maior nas piometras fechadas, uma vez que as concentrações de RP4s são maiores no epitélio glandular da condição fechada.

De acordo com Galabova-Kovacs *et al.* (2003), existe uma relação inversa entre os níveis de progesterona plasmática e as concentrações de RPs. Se forem considerados os resultados da presente pesquisa, os valores de progesterona foram maiores (8,2ng/mL) nas piometras abertas e, portanto, seria esperada uma concentração menor de RPs, o que concorda com os autores acima mencionados e com a imunorreatividade observada nesta pesquisa.

Escores imunoistoquímicos de RP4s nuclear nas várias camadas do útero com HEC-piometra, durante o diestro, foram baixos de acordo com Dhaliwal *et al.* (1999). Concluiu-se, neste estudo, que há uma sensibilidade aumentada à ação de P4, pois altos níveis de P4 parecem ativar os RP4s no útero, provocando uma intensa diminuição na expressão e supressão dos REs.

Não foi observada diferença nas concentrações de RP4s entre a piometra aberta e a fechada na cérvix, entretanto a intensidade de marcação dos RP4s foi mais forte no estroma quando comparada com as intensidades mais fracas dos epitélios glandular e luminal. Portanto, existe um maior número de RP4s no estroma quando comparado às outras regiões da cérvix.

Os resultados deste experimento estão de acordo com os achados de Kunkitti *et al.* (2011), nos quais não foi verificada diferença significativa entre as cadelas com piometra aberta e piometra fechada utilizando como variáveis o número de núcleos positivos para receptores de estrógenos e progesteronas.

De Cock *et al.* (1997), de Bosschere *et al.* (2002a), de Bosschere *et al.* (2002b), de Bosschere *et al.* (2003) e Ververidis *et al.* (2004) estudaram os receptores de estrógenos e progesteronas no útero de cadelas normais e com HEC-piometra. Os resultados demonstraram diferenças importantes entre o número de REs e RP4s em cadelas com HEC e cadelas com piometra. As diferenças na expressão desses receptores sugerem fatores distintos na patogênese da HEC e da piometra. Esses autores, entretanto, não consideraram as diferenças dos receptores hormonais no mecanismo de abertura ou fechamento da cérvix.

A cérvix é a parte inferior do útero que apresenta poucas fibras musculares lisas e grande quantidade de tecido conjuntivo. A mucosa cervical é constituída por um epitélio prismático simples de células produtoras de muco e uma lâmina própria onde se encontram as glândulas cervicais. Na fase secretória do ciclo estral, os elevados níveis de progesterona influenciam essas glândulas a produzirem muco viscoso, que impede a passagem de microrganismos e de espermatozoides para dentro da cavidade uterina (Junqueira e Carneiro, 1999).

A invasão de células inflamatórias tem sido sugerida como uma possível causa de degradação de colágenos e relaxamento cervical; em mulheres, o grau de dilatação cervical está diretamente relacionado com a extensão do infiltrado neutrofílico, que pode posteriormente produzir enzimas colagenolíticas, como proteases e metaloproteinases. O aumento dessas enzimas pode degradar o colágeno recém-

sintetizado e, assim, diminuir a proporção colágeno:musculatura lisa na cérvix, interferindo no grau de relaxamento cervical em cadelas com doenças uterinas (Kunkitti *et al.*, 2011).

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

Analisou-se, neste estudo, a proporção de colágenos I e III no útero e na cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada, e não foi verificada diferença significativa entre as duas condições e nem entre os diversos tecidos investigados. Os resultados deste estudo demonstraram apenas que não houve diferença na proporção de colágenos entre a piometra aberta e a fechada.

As hipóteses inicialmente aventadas para explicar os mecanismos de abertura e fechamento cervical não se concretizaram, ou seja, a identificação e as concentrações de RE $\alpha$  e RE $\beta$ , RP4 e colágenos I e III não estão implicadas nos mecanismos de relaxamento cervical. Avaliações das proporções de colágeno e fibras musculares são opções para o estudo da abertura cervical, conforme o considerado por Chatdarong *et al.* (2010), bem como o exame histológico comparativo da cérvix durante o trabalho de parto.

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

## CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos, conclui-se que os RE $\alpha$  e RE $\beta$ , colágenos I e III comportaram-se da mesma maneira na piometra aberta e na fechada, não estando envolvidos nos mecanismos de abertura e fechamento cervical, mas concentrações de receptores de progesterona foram mais elevadas nas piometras fechadas.

## REFERÊNCIAS

- ARORA, N.; SANDFORD, J.; BROWNING, G.F. *et al.* A model for cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, v.66, p.1530-1536, 2006.
- BOOS, A.; MEYER, W.; SCHWARZ, R. *et al.* Immunohistochemical assesment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.44, p.11-21, 1996.
- BREEVELD-DWARKASING, V.N.A.; BOER-BROUWER, M.; MÖSTL, E. *et al.* Immunohistochemical distribution of oestrogen and progesterone receptors and tissue concentrations of oestrogens in the cervix of non-pregnant cows. *Reprod. Ferti. Dev.*, v.14, p.487-494, 2002.
- CHATDARONG, K.; LINHARATTANARUKSA, P.; SIRIVAIYAPONG, S.; SRISUWATAMASAKUL, S. The proportions of Smooth Muscle and Collagen in the Cervical Tissue of Bitches During Various Stages of the Estrous Cycle and Bitches Developing. In: *Proceedings 9<sup>th</sup> CHULALONGKORN UNIVERSITY VETERINARY SCIENCE THE ANIMAL COMPANY*, 2010, v.1, p.129.
- CHATDARONG, S.; KUNKITTI, P.; SRISUWATANASAGUL, S. P2 Distribution of Oestrogen Receptor and Progesterone Receptor and Leukocyte Infiltration in Canine Cervical Tissue. In: *Proceedings 7<sup>th</sup> CHULALONGKORN UNIVERSITY VETERINARY SCIENCE THE ANIMAL COMPANY*, 7., 2008, v.1, p.58.
- COGGAN, J.A.; OLIVEIRA, C.M.; FAUSTINO, M. *et al.* Microbiological study of intrauterine 440 secretion from bitches with pyometra and research of virulence factors of Escherichia 441 coli isolates. *Arq. Inst. Biol.*, v.71, p.1-749, 2004.
- DHALIWAL, G.K.; ENGLAND, G.C.W.; NOAKES, D.E. Oestrogen and progesterone receptors in the uterine wall of bitches with cystic endometrial hyperplasia/pyometra. *Veterinary Record*. v.145, p.455-7, 1999.
- DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; TSHAMALA, M. Uterine Oestrogen and Progesterone Receptor Expression in Experimental Pyometra in the Bitch. *J. Comp.Pathol.*, v.128, p.99-106, 2003.
- DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H. *et al.* Estrogen and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. *Anim. Reprod. Sci.*, v.70, p.251-259, 2002a.
- DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; TSHAMALA, M.; CORY, M. Changes in sex hormone receptors during administration of progesterone to prevent estrus in the bitch. *Theriogenology*, v.58, p.1209-1217, 2002b.
- DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; VAN DEN BROECK, W. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected. *Theriogenology*, v.55, p.1509-1519, 2001.
- DE COCK, H.; VERMEIRSCH, H.; DUCATELLE, R.; DE SCHEPPER, J. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cystic-endometritis-pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, v.48, p.1035-1047, 1997.
- DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Vet. Rec.*, v.69, p.1409-1415, 1957.
- DOW, C. The cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Vet. Rec.*, v.70, p.1102-1108, 1958.
- FERREIRA, C.R.; LOPES, M.D. Complexo – hiperplasia cística endometrial/piometra em cadelas – revisão. *Rev. Clin. Vet.*, n.25, p.36-44, 2000.
- GALABOVA-KOVACS, G., WALTER, I., AURICH, C., AURICH, J.E. Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro conditions. *Theriogenology*, v.61, p.963-976, 2004.
- GOERICKE-PESCH, S.; SCHMIDT, B.; FAILING, K.; WEHREND, A. Changes in the histomorphology of the canine cervix through the oestrus cycle. *Theriogenology*, v.74, p.1075-1081, 2010.
- HAGMAN, R.; LAGERSTEDT, A.S.; HEDHANMAR, A.; EGENVALL, A. A breed-matched case-control study of potential risk-factors of canine pyometra. *Theriogenology*, v.75, p.1251-1257, 2011.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Feminino. In: *Histologia Básica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. p.367-88, 1999.

### *Imunoistoquímica de útero...*

- KUNKITTI, P.; SRISUWATANASAGUL, S.; CHATDARONG, K. Distribution of estrogen receptor alpha and progesterone receptor, and leukocyte infiltration in the cervix of cyclic bitches and those with pyometra. *Theriogenology*, v.75, p.979-987, 2011.
- MARTIN, I. *Avaliação imunoistoquímica dos receptores de progesterona (isoformas A e B), estrógenos  $\alpha$  e  $\beta$ , hormônio luteinizante e das enzimas aromatase citocromo P450 e caspase-3 no corpo lúteo de vacas nelore (Bos taurus indicus) durante o ciclo estral*. 2009. 117f. Tese (doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- MARTIN, I.; TORRES NETO, R.; OBA, E. *et al.* Immunohistochemical Detection of Receptors for Oestrogen and Progesterone in Endometrial Glands and Stroma during the Oestrous Cycle in Nelore (Bos taurus indicus) Cows. *Reprod. Domest. Anim.*, v.43, p.415-421, 2008.
- MARTINS, D.G. *Complexo hiperplasia endometrial cística/piometra em cadelas: fisiopatogenia, características clínicas, laboratoriais e abordagem terapêutica*. Jaboticabal, 2007. 54f. Dissertação (mestrado em cirurgia veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, câmpus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista.
- OLIVEIRA, K.S. Cystic endometrial hyperplasia complex. *Acta Sci. Vet.*, v.35, p.270-272, 2007.
- OLIVEIRA, P.C.; LOPES, M.D.; THOMÉ, H.E.; BALIEIRO, J.C.C. Avaliação citológica, histológica e hormonal de cadelas normais e com complexo hiperplasia endometrial cística/piometra. *Vet. Zootec.*, v.15, p.150-159, 2008.
- PRETZER, S.D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. *Theriogenology*, v.70, p.359-363, 2008.
- RAGNI, R.A. Pyometra in a bitch following unusual sterilisation. *J. Small Anim. Pract.*, v.46, p.39-40, 2005.
- ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; WATHES, D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptor in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, v.122, p.965-979, 2001.
- SMITH, F.O. Canine pyometra. *Theriogenology*, v.66, p.610-612, 2006.
- VERVERIDIS, H.N.; BOSCOVA, C.M.; STEFANAKISB, A. *et al.* Serum estradiol-17 $\beta$ , progesterone and respective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra. *Theriogenology*, v.62, p.614-633, 2004.
- WEISS, R.R.; CALOMENO, M.A.; SOUSA, R.S. *et al.* Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela. *Arch. Vet. Sci.*, v.9, p.81-87, 2004.