

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**Aspectos morfológicos e imunohistoquímicos de cadelas com hiperplasia  
endometrial cística após ovariectomia**

Beatriz Ibrahim Miranda Antunes  
*Magister Scientiae*

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**BEATRIZ IBRAHIM MIRANDA ANTUNES**

**Aspectos morfológicos e imunohistoquímicos de cadelas com hiperplasia  
endometrial cística após ovariectomia**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Fabiana Azevedo Voorwald

Coorientadores: Marco A. Machado Silva  
Carlos E. Fonseca Alves  
Pedro P. Maia Teixeira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus**

T

A636a  
2024

Antunes, Beatriz Ibrahim Miranda, 1995-

Aspectos morfológicos e imunohistoquímicos de cadelas com hiperplasia endometrial cística após ovariectomia: / Beatriz Ibrahim Miranda Antunes. - Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (36 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Fabiana Azevedo Voorwald

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, 2024.

Referências bibliográficas: .

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.036>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cães - Doenças; 2. Útero - Histologia; 3. Hiperplasia endometrial; 4. Piometra; 5. Estrógenos; 6. Progesterona; I. Voorwald, Fabiana Azevedo II. Universidade Federal de Viçosa.. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária III.  
Título

CDD 22. ed. 636.70898142

Bibliotecário(a) responsável: EUZEBIO LUIZ PINTO CRB-6/3317

**BEATRIZ IBRAHIM MIRANDA ANTUNES**

**Aspectos morfológicos e imunohistoquímicos de cadelas com hiperplasia endometrial cística após ovariectomia**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de dezembro de 2024.

Assentimento:

---

Beatriz Ibrahim Miranda Antunes  
Autora

---

Fabiana Azevedo Voorwald  
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 28/01/2025 às 13:17:55 e pela orientadora em 13/02/2025 às 10:39:52. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **PL9V.G17C.1WLV** e clique no botão 'Validar documento'.

## **AGRADECIMENTOS**

Este projeto é a somatória da dedicação e esforço de queridos e competentes amigos e colegas de profissão que me apoiaram ao longo de dois anos e tornaram possível a concretização do trabalho apresentado. Ana Carolina Mateus, Nathalia Brioschi, Victória Kanadani, Thais Oliveira, Elaine Soares, Carol Camargos, Rafael Fabossi, Fernanda Carvalho, dentre outros. Cada um de vocês foi fundamental para que este projeto fosse colocado em prática da melhor maneira possível.

Ao meu marido e melhor amigo, Ricardo. Agradeço por todo o companheirismo, paciência e compreensão. Obrigada por sempre me incentivar a ser uma pessoa melhor, a manter o otimismo e me proporcionar momentos de leveza e tranquilidade. À minha amada família, que sempre se dedicou e me proporcionou a melhor formação pessoal e profissional possível. O amor e exemplo de vocês me trouxe à pessoa que sou hoje.

À minha orientadora, Fabiana, por todos os ensinamentos, paciência e incentivo. Agradeço imensamente por ser tamanha fonte de admiração e respeito, além de maior exemplo de dedicação, competência e amor pela profissão que conheço. Aos meus coorientadores, agradeço por toda a cooperação e auxílio ao longo de todo o projeto.

Por fim, mas igualmente importante, agradeço a todos os tutores e cadelas inclusos nesse projeto. A cada tutor que concedeu a participação das suas queridas amigas de quatro patas, não tenho palavras para descrever minha gratidão pela confiança e por tornarem esse projeto uma realidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

ANTUNES, Beatriz Ibrahim Miranda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2024. **Aspectos morfológicos e imunohistoquímicos de cadelas com hiperplasia endometrial cística após ovariectomia.** Orientadora: Fabiana Azevedo Voorwald. Coorientadores: Marco Augusto Machado Silva, Carlos Eduardo Fonseca Alves e Pedro Paulo Maia Teixeira.

A hiperplasia endometrial cística (HEC) é uma alteração fisiológica comum em cadelas adultas em diestro, que pode tornar o ambiente uterino propício a infecções bacterianas. Sabe-se que as interações hormonais, principalmente entre progesterona e estrógeno são peças-chave no desenvolvimento do complexo HEC-piometra. Porém, muitas dúvidas permanecem a respeito de sua etiopatogenia. Objetiva-se com o presente estudo, avaliar aspectos morfológicos macro e microscópicos, e imunohistoquímicos do útero de cadelas com hiperplasia endometrial cística seis meses após ovariectomia. Propõe-se uma nova abordagem, a conhecimento dos autores ainda não descrita em literatura, para agregar novas informações afim de contribuir para o entendimento da alteração em questão e possivelmente estabelecer novas diretrizes para a cirurgia obstétrica e reprodução na medicina veterinária. Observou-se que a ausência dos hormônios esteroidais leva à importante regressão do tecido uterino e da hiperplasia glândular cística do endométrio. Observou-se evidente redução do grau de hiperplasia em 12 das 17 cadelas em diestro. Houve redução de pelo menos 50% da espessura total uterina, do endométrio e miométrio em 15 cadelas em diestro. Houve redução da imunomarcagem de receptores de estrógeno e progesterona em 10 e 13 cadelas na fase de diestro, respectivamente. A imunomarcagem de marcador de proliferação celular reduziu em 13 das 17 cadelas em diestro. Esse estudo reafirma o importante papel desempenhado pelos hormônios esteroidais ao demonstrar macroscópica, molecular e histologicamente a regressão do tecido glandular endometrial hiperplásico, ao realizar-se ovariectomia em cadelas. A ovariectomia mostrou-se efetiva para regressão da hiperplasia endometrial, reiterando a técnica como uma alternativa viável à ovariohisterectomia.

Palavras-chave: piometra; progesterona; estrógeno; ki-67; histologia.

## ABSTRACT

ANTUNES, Beatriz Ibrahim Miranda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2024. **Uterine morphological and immunohistochemical aspects of bitches with cystic endometrial hyperplasia after ovariectomy.** Adviser: Fabiana Azevedo Voorwald. Co-advisers: Marco Augusto Machado Silva, Carlos Eduardo Fonseca Alves and Pedro Paulo Maia Teixeira.

Cystic endometrial hyperplasia (CEH) is a common physiological affection in adult female dogs in diestrus, which can make the uterine environment susceptible to bacterial infections. It is known that hormonal interactions, mainly between progesterone and estrogen, are key players in the development of the CEH-pyometra complex, but many questions remain regarding its etiopathogenesis. The present study proposes a new approach, to the authors' knowledge not yet described in literature, to add new information in order to contribute to the understanding of this affection and possibly establish new guidelines for obstetric surgery and reproduction in veterinary medicine. It is demonstrated that the absence of steroidal hormones leads to significant regression of uterine tissue and glandular hyperplasia, as well as reduction in estrogen and progesterone receptors and markers of tissue proliferation, in the uterus of female dogs, six months after ovariectomy. Significant involution of endometrial hyperplasia was observed, as the size and macroscopic appearance of the uterus. This study reaffirms the important role played by steroid hormones in demonstrating macroscopically, molecularly and histologically the regression of hyperplastic endometrial and glandular tissue when performing ovariectomy in female dogs. Ovariectomy proved to be effective for regression of endometrial hyperplasia, reiterating the technique as a viable alternative to ovariohysterectomy.

Keywords: pyometra; progesterone; estrogen; ki-67; histologia

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diâmetro de corno uterino esquerdo (A) e corpo uterino (B) após primeiro (S1) e segundo (S2) procedimentos cirúrgicos ( $p < 0.0001$ ). .....18
- Figura 2 - Morfologia macroscópica de cornos uterinos com HEC de grau 1 (A), 2 (B) e 3 (C), em corte longitudinal. Observam-se estruturas císticas (setas), irregularidade e espessamento de superfície endometrial, além da presença de secreção mucosa à hemorrágica intraluminal (\*). .....19
- Figura 3 - Fotomicrografia de úteros de cadelas em diestro com HEC. Observam-se formações císticas focais (A,C,E) e acentuada lesão cística difusa (F) em endométrio. Percebe-se evidente hiperplasia de estroma e glândulas endometriais (B) e projeção polipoide associada à hiperplasia cística (D). .....21
- Figura 4 - Fotomicrografia de corno uterino esquerdo de cadelas seis meses após ovariectomia. Observa-se expressiva redução no tamanho e número de glândulas e ausência de grandes estruturas císticas. ....22
- Figura 5 - Fotomicrografia de tecido uterino de cadelas em diestro, com HEC. Observa-se hiperplasia do epitélio endometrial (A, B, C, D) e do epitélio glandular (D, E), além do ECPC (G) e ectasia glandular (D, F, H). .....23
- Figura 6 - Imunomarcção média de fator de proliferação celular ki-67 (A), receptores de estrógeno (B) e receptores de progesterona (C) em cadelas com HEC, em diestro. ....25
- Figura 7 - Fotomicrografia de imunomarcção de receptores de estrógeno (A,B), progesterona (C,D) e Ki-67 (E,F), antes (à esquerda) e seis meses após ovariectomia (à direita). Observa-se marcação nuclear predominantes em células glandulares (setas vermelhas) e células do epitélio luminal (setas pretas). .....26
- Figura 8 - Aspecto ultrassonográfico (A), morfológico macroscópico (B) e histológico (C) de cadela em diestro com HEC grau III. A: Observa-se lúmen uterino (\*) distendido por conteúdo anecogênico de baixa celularidade. Setas brancas indicam paredes uterinas; B: Presença de múltiplos cistos endometriais (seta preta) distribuídos difusamente por toda a superfície, associados à secreção mucosa à discretamente hemorrágica; C: Acentuada lesão cística difusa, com presença de conteúdo mucoso (\*) alterando a arquitetura normal do endométrio (1: serosa; 2: miométrio; 3: endométrio).....28
- Figura 9 - Aspecto ultrassonográfico (A), morfológico macroscópico (B) e histológico (C) de cadela seis meses após ovariectomia. A: Observa-se lúmen uterino (\*) sem conteúdo. Setas brancas indicam paredes uterinas; B: Ausência de cistos endometriais. Observa-se superfície endometrial lisa e regular, sem secreção; C: Observa-se endométrio sem características hiperplásicas, glândulas sem dilatação evidente (\*) e ausência de estruturas císticas (1: serosa; 2: miométrio; 3: endométrio; 4: lúmen). .....28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medidas médias e desvio padrão, e características histológicas de cadelas em diestro com hiperplasia endometrial cística, após primeira (S1) e segunda (S2) cirurgias.....	20
Tabela 2 - Resumo do método semiquantitativo para análise do escore imunohistoquímico em útero de cadelas para Anti-Pr e Anti-E. Objetiva x40. ....	24
Tabela 3 - Número de cadelas em diestro por escore de marcação imunohistoquímica de receptores de progesterona (RP) e estrógeno (RE) no endométrio, na primeira (S1) e segunda (S2) cirurgias.....	24
Tabela 4 - Resumo de variáveis obtidas por imunohistoquímica, de segmentos uterinos provenientes nas 20 cadelas avaliadas. S1: Ovariectomia + Histeresctomia direita; S2: Histerectomia esquerda. ....	31
Tabela 5 - Resumo de variáveis obtidas de ultrassonografia e evolução histológica das espessuras de parede uterina total, endométrio e miométrio, aferidas nas 20 cadelas avaliadas. S1: Ovariectomia + Histeresctomia direita; S2: Histerectomia esquerda. ....	31

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

kg – Quilogramas

UFV – Universidade Federal de Viçosa

µm - Micrômetros

HEC - Hiperplasia Endometrial Cística

HEC-P - Hiperplasia Endometrial Cística - Piometra

RE - Receptores de Estrogênio

RP - Receptores de Progesterona

mL - Mililitros

AST - Aspartato Aminotransferase

ALT - Alanina Aminotransferase

FA - Fosfatase Alcalina

mg - Miligrama

cm - Centímetro

ECPC - Epitélio Cilíndrico Pseudoestratificado Ciliado

ECSC - Epitélio Cúbico Simples Ciliado

EPS - Epitélio Pavimentoso Simples

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

**Aspectos morfológicos e imunohistoquímicos de cadelas com hiperplasia endometrial  
cística após ovariectomia**

(Texto estruturado segundo as normas de publicação da revista NATURE - Scientific Reports)

Beatriz Ibrahim Miranda Antunes<sup>a\*</sup>, Fabiana Azevedo Voorwald<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Viçosa.  
Av. P.H Rolfs, s/n, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

\*Autor correspondente:

Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Viçosa.

Av. P.H Rolfs, s/n, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: b.ibrahim1308@gmail.com

Telefone - +55 (31) 999429357

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1.	Local do estudo e seleção de cadelas.....	13
2.2.	Ética no uso de animais.....	13
2.3.	Exames hematológicos e bioquímicos.....	13
2.4.	Exame colpocitológico.....	14
2.5.	Exame ultrassonográfico.....	14
2.6.	Procedimentos cirúrgicos e coleta de amostras uterinas.....	14
2.7.	Análise macroscópica.....	15
2.8.	Processamento e análise histológica.....	15
2.9.	Processamento e análise imunohistoquímica.....	16
3.	RESULTADOS.....	17
3.1.	Perfil das cadelas selecionadas.....	17
3.2.	Colpocitologia.....	17
3.3.	Análise ultrassonográfica.....	17
3.4.	Análise morfológica macroscópica.....	18
3.5.	Análise histológica.....	19
	23	
3.6.	Análise imunohistoquímica.....	24
3	DISCUSSÃO.....	27
4	CONCLUSÃO.....	32
5	REFERÊNCIAS.....	32
7.	ANEXOS.....	35
7.1.	Anexo I.....	35
7.2.	Anexo II.....	36

## 1 INTRODUÇÃO

A castração é uma das cirurgias mais realizadas na rotina veterinária de pequenos animais<sup>[1]</sup>. Diferentes técnicas são utilizadas para realizar controle populacional de cães e gatos, tratamento e prevenção de afecções hormônio dependentes<sup>[2]</sup>. Há divergência entre cirurgiões pela técnica de ovariectomia ou ovariohisterectomia por questões culturais<sup>[2]</sup>, falta de familiaridade com a técnica de ovariectomia e receio da ocorrência de afecções uterinas após remoção das gônadas e manutenção do útero<sup>[2,3]</sup>. No entanto, não há estudos que demonstrem a ocorrência de piometra em cadelas submetidas à ovariectomia, a menos que esta receba hormônios exógenos após o procedimento<sup>[3,4]</sup>. Ademais, tumores uterinos em cadelas são raros, correspondendo a menos de 0,5% dos tumores na espécie, dos quais 90% são benignos e hormônio dependentes<sup>[2,5]</sup>.

A hiperplasia endometrial cística (HEC) é uma das alterações obstétricas mais comuns em cadelas adultas<sup>[6,7]</sup>, podendo atingir mais de 50% das cadelas acima de sete anos<sup>[5]</sup>. É uma condição fisiológica caracterizada pela proliferação de glândulas endometriais, hiperplasia endometrial e formações císticas<sup>[6]</sup>. Ocorre em consequência à fase de diestro prolongada na espécie, na qual o útero permanece sob os efeitos de altas concentrações séricas de progesterona, estando gestante ou não<sup>[8,9]</sup>. Quando associada à infecção uterina, recebe a nomenclatura de síndrome de hiperplasia endometrial cística – piometra (HEC-P). Constitui uma das mais importantes e frequentes afecções do trato reprodutivo da espécie canina<sup>[10]</sup>, atingindo de 20 a 50% de cadelas até os 10 anos de idade<sup>[5]</sup>. A HEC isolada pode ser considerada um estágio prévio à piometra, uma condição favorável à proliferação bacteriana, caso ocorra a colonização por via ascendente ou hematogena<sup>[9,11,12]</sup>. Cadelas adultas são constantemente submetidas a alterações hormonais a cada fase do ciclo estral, principalmente progesterona e estradiol, tornando-se mais susceptíveis à HEC, mas não necessariamente caracterizando uma condição patológica<sup>[10,13]</sup>. A HEC e a piometra são frequentemente correlacionadas, porém são condições que podem ser diagnosticadas independente uma da outra<sup>[7,10,11,14,15]</sup>.

Apesar de extensivamente estudado, a etiopatogenia da síndrome não é completamente esclarecida<sup>[10,11,15,16]</sup>. A determinação dos mecanismos etiológicos e diferenciação das fases de seu desenvolvimento são considerados grandes desafios na obstetrícia veterinária, levando a diagnósticos frequentemente tardios que culminam na ovariohisterectomia terapêutica<sup>[16]</sup>. Diversos autores buscam informações sobre a origem e progressão da afecção através de análises histopatológicas<sup>[8,10]</sup>, imaginológicas<sup>[5,16,17]</sup>, e identificação de marcadores moleculares

[6,7,16,18,19]. Porém, muitos questionamentos permanecem sobre o comportamento uterino quanto aos processos proliferativos e vasculares no processo de HEC-P.

A conhecimento dos autores, não há um estudo controlado que demonstre o comportamento e alterações no útero de cadelas com HEC após procedimento de ovariectomia. O presente estudo tem por finalidade avaliar o tecido uterino quanto à morfologia, histologia e aspectos moleculares de cadelas diagnosticadas com HEC submetidas à ovariectomia.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Local do estudo e seleção de cadelas**

O projeto de pesquisa foi conduzido no Hospital Veterinário de Pequenos Animais, no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Foram pré-selecionadas cadelas adultas, clinicamente híginas em fase de diestro para o estudo. Todos os indivíduos passaram por anamnese geral e de histórico reprodutivo. Realizou-se avaliação física, inspeção macroscópica vulvar, ultrassonografia abdominal e exames hematológicos previamente à realização de ambos os procedimentos cirúrgicos. Realizou-se colpocitologia para determinação do ciclo estral das cadelas. Pacientes com alterações clínicas, gestantes ou com alterações aos exames hematológicos e bioquímicos foram excluídos do estudo. Foram selecionadas para o grupo de estudo final àquelas que, ao exame histopatológico, apresentaram hiperplasia endometrial cística.

### **2.2. Ética no uso de animais**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFV sob o protocolo 31/2022. Todas as cadelas do projeto pertenciam à tutores dispostos a colaborar voluntariamente, elucidados e de comum acordo por escrito, quanto à necessidade de dois procedimentos cirúrgicos no intervalo de seis meses.

### **2.3. Exames hematológicos e bioquímicos**

Foram coletados três mililitros de sangue total da veia jugular, para exames de hemograma, leucograma e bioquímica sérica (ureia, creatinina, fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), proteínas totais e albumina). O processamento e análise dos exames foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Medicina Veterinária na UFV (Viçosa, MG).

#### **2.4. Exame colpocitológico**

A citologia vaginal foi realizada através da introdução de swab estéril no vestíbulo vaginal, em região dorsal da porção cranial do canal vaginal. Realizou-se movimentos de rotação para aquisição de células epiteliais. Imediatamente após a aquisição do material, o mesmo foi depositado em lâminas de vidro por meio de rolamento do swab, em sentido único para deposição uniforme das células. As lâminas foram coradas pelo protocolo de Romanowsky modificado (Panótico rápido), e analisadas para determinação do ciclo estral de cada cadela.

#### **2.5. Exame ultrassonográfico**

Realizou-se avaliação ultrassonográfica com equipamento Esaote MyLab 30 (Esaote Medical Systems, Itália) configurado em modo B (2D- escada de cinza), com transdutor linear (10-18MHz) para inspeção de toda a cavidade abdominal para descarte de quaisquer alterações ou presença de fetos. Os ovários foram analisados quanto ao seu padrão de ecogenicidade e presença de estruturas cavitárias. O útero foi avaliado quanto ao seu diâmetro e presença de conteúdo no lúmen antes e seis meses após a ovariectomia.

#### **2.6. Procedimentos cirúrgicos e coleta de amostras uterinas**

Após jejum alimentar de 8 horas, as pacientes foram submetidas à medicação pré-anestésica intramuscular com morfina (0,3mg/ml) e acepromazina (0,03mg/kg) e à indução anestésica com propofol (6mg/kg) por via endovenosa. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano por via inalatória em circuito fechado.

Após realização de tricotomia da região ventral do abdômen, as pacientes foram posicionadas em decúbito dorsal para antisepsia do campo cirúrgico com clorexidine degermante a 2%, finalizada com clorexidine alcoólico a 0,5%. Realizou-se celiotomia em linha média ventral sobre cicatriz umbilical, para acesso à cavidade abdominal. O ovário direito foi exposto juntamente ao corno uterino direito. O ligamento suspensório ovariano foi rompido digitalmente durante isolamento e exposição do ovário. Realizou-se dupla ligadura de artéria e veia ovarianos, corno e vasos uterinos direitos imediatamente cranial à bifurcação uterina, utilizando-se fio de poliglactina 910 2-0. A ovariectomia esquerda foi obtida através da ligadura e secção do ligamento próprio ovariano, ligamento suspensório e vasos ovarianos com mesmo fio. Realizou-se celiorrafia em padrão Colchoeiro Cruzado, com fio de diâmetro apropriado para cada cadela. Tecido subcutâneo foi aproximado em padrão simples contínuo, com poliglactina 910 e dermorrafia realizada com náilon em padrão simples interrompido.

Estabeleceu-se como protocolo terapêutico em pós-operatório imediato, a administração de dipirona (25mg/kg), cloridrato de tramadol (3mg/kg) e meloxicam (0,1mg/kg) por via endovenosa. Terapias analgésica e antiinflamatória por via oral foram prescritas por um período de 3 dias após o procedimento. Seis meses após, realizou-se histerectomia esquerda através de mesmo acesso abdominal e técnica cirúrgica como previamente realizados para o primeiro procedimento. O protocolo terapêutico pós-cirúrgico foi estabelecido tal como descrito previamente.

Ao total, foram coletados três fragmentos do corno uterino direito e esquerdo durante primeiro e segundo procedimentos, respectivamente. Cada amostra foi seccionada em sentido transversal, medindo aproximadamente 1 cm, de modo a apresentar as três camadas (perimétrio, miométrio e endométrio), das regiões proximal, média e distal, e acondicionados em potes coletores preenchidos por solução de formalina tamponada a 10% em temperatura ambiente, para análises histológica e imunohistoquímica. Após 48 horas, as amostras foram transferidas para pote coletor com álcool 70% e mantidas até o momento de processamento e análise.

## **2.7. Análise macroscópica**

Os cornos uterinos direito e esquerdo, coletados no primeiro e segundo procedimentos cirúrgicos respectivamente, foram avaliados quanto às características morfológicas macroscópicas, imediatamente após a remoção. Após secção em sentido longitudinal, os cornos foram avaliados quanto à coloração, espessura de parede, presença de formações císticas, aspecto da superfície endometrial e presença de secreção luminal.

## **2.8. Processamento e análise histológica**

Após o período de estocagem, as amostras foram transferidas para recipiente com álcool 70% e passaram por processo de rotina para confecção de lâminas histológicas (desidratação, diafanização e inclusão em parafina)<sup>[20]</sup>. Cortes histológicos de 5 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura foram obtidos e corados rotineiramente com hematoxilina e eosina, seguido por avaliação ao microscópio de luz.

Os cortes histológicos foram avaliados quanto às características morfológicas para classificação em graus da HEC previamente estabelecidas<sup>[21]</sup>. Além disso, foram realizadas as seguintes mensurações: espessura da parede uterina total; diâmetro de lúmen uterino; altura e classificação do epitélio endometrial; maior e menor espessuras de endométrio; maior diâmetro da maior glândula endometrial; altura dos epitélios glandulares e espessura total de miométrio. Todas as medidas são uma média de cinco campos diferentes de cada amostra histológica, em

cortes transversais, e aferidas em micrômetros através do programa de análises de imagens para histomorfometria ImageJ<sup>[22]</sup>.

## **2.9. Processamento e análise imunohistoquímica**

A partir do material incluído em parafina, seções de 4µm foram colocadas em lâminas polarizadas (Starfrost, Knittel, Bielefeld, Alemanha) e secas em estufa (57°C). Após protocolo de deparinização, as lâminas foram incubadas por 45 minutos em solução de citrato (pH 6,0) em panela de pressão (Pascal, Dako, Carpinteria, CA, USA). A análise da imunocoloração dos anticorpos foi realizada com microscópio óptico, e as expressões foram classificadas como positiva ou negativa. Para o bloqueio da proteína, utilizou-se leite desnatado Molico 5% diluído em água e as amostras foram mantidas em estufa a 27°C por 40 minutos. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado utilizando-se peróxido de hidrogênio 8%, diluído em álcool metílico por 15 minutos em temperatura ambiente. Os fragmentos foram incubados overnight a 4 °C com anticorpos anti-receptor progesterona policlonal, (Dako, Carpinteria, CA, EUA); anti-receptor estrogênio monoclonal (clone PPG5/10; Dako, Carpinteria, CA, EUA), utilizados em protocolos padronizados de diluição (1:50) e anti-Ki67 monoclonal (clone MIB-1; Dako, Carpinteria, CA, EUA) solução pronta para uso. As seções foram contracoradas com hematoxilina de Harris (Dinamica-Diadema, Diadema, Brasil).

Para avaliação da expressão de Ki-67, cada lâmina foi avaliada em três regiões diferentes, e 100 células por região foram avaliadas para o cálculo percentual de células positivamente marcadas. Para avaliação de receptores de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), realizou-se avaliação semi-qualitativa para classificação do grau de marcação das células do epitélio glandular. Todas as lâminas foram avaliadas através de microscópio de luz Opticam 0500R (Opticam Microscopy Technology).

## **2.10. Análise estatística**

Os dados foram analisados no Statistical Analysis System (SAS OnDemand). Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade. Os dados de mensuração ultrassonográfica do corpo uterino, imunomarcação de Ki-67 e mensurações histológicas apresentaram distribuição normal. Os resultados provenientes do primeiro e segundo procedimentos cirúrgicos foram comparados pelo teste t para amostras pareadas (Procedimento TTEST). Os dados com distribuição não normal e qualitativos (mensuração ultrassonográfica de corno uterino esquerdo, imunomarcação de RE e RP, e grau de HEC) foram analisados pelo teste Wilcoxon Signed Rank (Procedimento UNIVARIATE). Os dados

da colpocitologia vaginal foram analisados pelo teste exato de Fisher (Procedimento FREQ). Os dados categóricos de morfometria uterina foram analisados pelo teste de McNemar (Procedimento FREQ). As correlações entre as variáveis imunohistoquímicas analisadas e o grau de HEC foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman (procedimento CORR). O nível de significância adotado para todas as análises foi  $p = 0,05$ .

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Perfil das cadelas selecionadas**

Vinte cadelas entre 3 e 11 anos de idade, nulíparas, sem histórico prévio de administração de progestágeno exógeno foram selecionadas para os procedimentos cirúrgicos. De acordo com a anamnese, todas as cadelas encontravam-se entre 15 e 60 dias pós término do estro. Dentre as cadelas avaliadas, havia 12 sem raça definida, 2 Shih-Tzus, duas Pinschers, uma Basenji, uma Cocker Spaniel, uma Beagle e uma Fila Brasileiro. Confirmou-se HEC em 17 cadelas através do exame histopatológico.

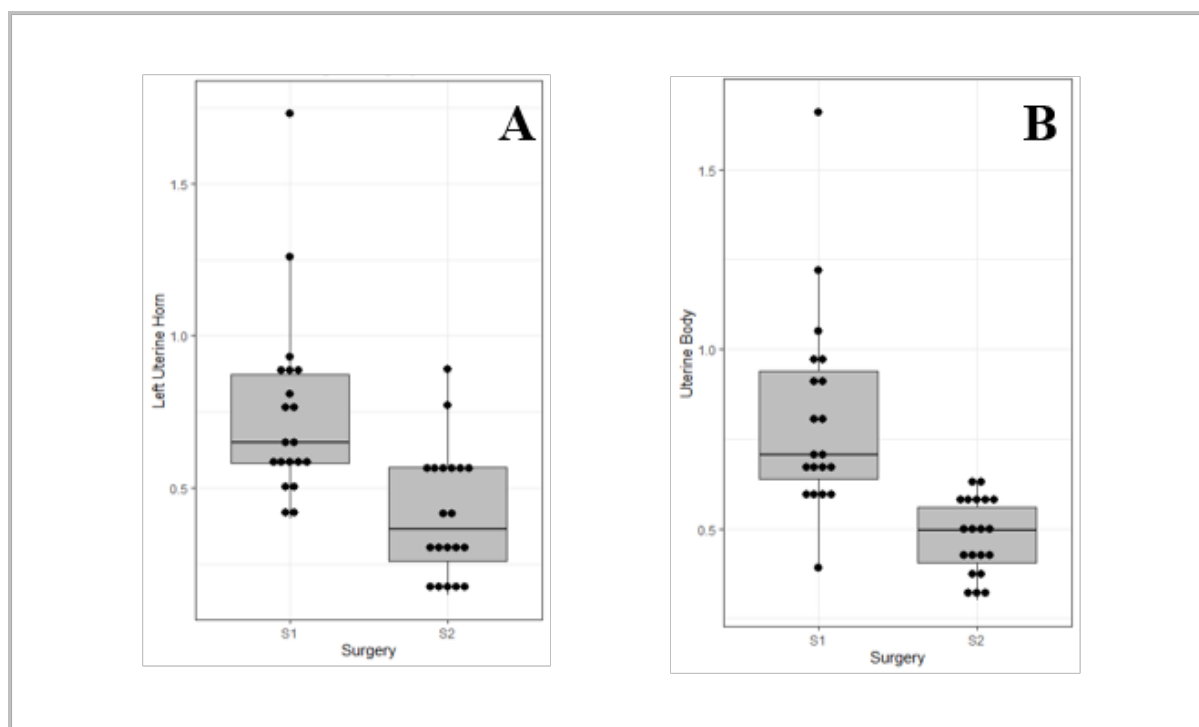
#### **3.2. Colpocitologia**

A colpocitologia vaginal indicou que no momento da primeira cirurgia, 17 fêmeas (85%) apresentaram citologia compatível com diestro, duas (10%) em anestro e uma (5%) em proestro. As cadelas em diestro apresentaram aproximadamente 75% de células intermediárias, 15% de células parabasais, além de células superficiais, e neutrófilos. Destas, oito fêmeas apresentavam ainda grande quantidade de muco vaginal em fundo de lâmina. As cadelas em anestro apresentaram aproximadamente 75% de células parabasais e 25% de células intermediárias pequenas na citologia. Já a fêmea em proestro, apresentava células superficiais nucleadas e anucleadas, além de células parabasais e intermediárias. No momento da segunda cirurgia, todas as fêmeas apresentaram colpocitologias características de anestro.

#### **3.3. Análise ultrassonográfica**

Nenhuma cadela apresentou lesões cavitárias ou alterações de ecogenicidade em ovários e útero. Observou-se redução de diâmetro do corno uterino esquerdo e do corpo uterino em todas as cadelas, seis meses após a ovariectomia (Figura 1). Em sete cadelas observou-se dilatação de lúmen uterino por conteúdo anecogênico previamente à ovariectomia. Seis meses após, não apresentaram mais conteúdo intraluminal significativo.

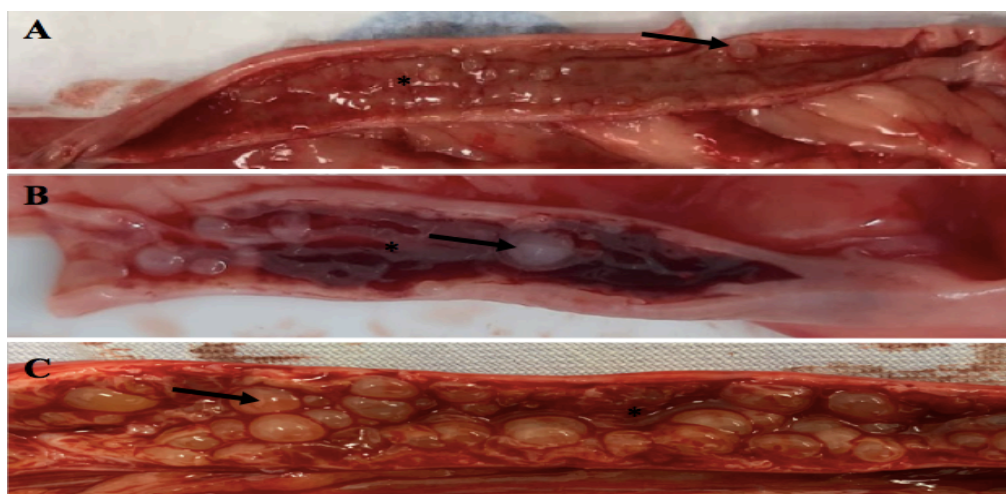
Figura 1 - Diâmetro de corno uterino esquerdo (A) e corpo uterino (B) após primeiro (S1) e segundo (S2) procedimentos cirúrgicos ( $p < 0.0001$ ).



### 3.4. Análise morfológica macroscópica

Em seis fêmeas, observou-se parede uterina espessa e congestionada, presença de conteúdo mucoso à hemorrágico intraluminal, irregularidade da superfície endometrial, além da presença de estruturas císticas, no corno uterino direito, colhido durante a ovariectomia (Figura 2). Sete cadelas apresentavam espessamento de endométrio, com superfície irregular, com pequenas estruturas císticas endometriais, porém sem conteúdo luminal. Cornos uterinos direitos provenientes de três cadelas apresentavam irregularidade e espessamento de parede, mas sem cistos visíveis nem conteúdo uterino. Quatro cornos uterinos não apresentavam alterações macroscópicas perceptíveis. Seis meses após ovariectomia, observou-se evidente redução da espessura de parede uterina e ausência de conteúdo luminal. O endométrio apresentava superfície lisa e regular, sem a presença de estruturas císticas visíveis macroscopicamente.

Figura 2 - Morfologia macroscópica de cornos uterinos com HEC de grau 1 (A), 2 (B) e 3 (C), em corte longitudinal. Observam-se estruturas císticas (setas), irregularidade e espessamento de superfície endometrial, além da presença de secreção mucosa à hemorrágica



### 3.5. Análise histológica

Como não houve diferença estatística significativa entre os segmentos coletados de um mesmo corno uterino, os resultados apresentados serão a média entre as três amostras. Foram adotados os critérios estabelecidos por Dow<sup>[21]</sup> para classificação dos graus de HEC observados nos cornos uterinos. Das 17 cadelas selecionadas em diestro com HEC, sete apresentaram grau I (41%); seis apresentaram grau II (35%); e quatro apresentaram grau III (23%). Seis meses após ovariectomia, 12 cadelas (70,2%) apresentaram redução do grau de HEC, enquanto cinco cadelas (29,8%) mantiveram o grau.

O útero das cadelas com HEC apresentou espessamento endometrial, contendo glândulas hiperplásicas e formações císticas distribuídas de maneira focal ou difusa (Figura 3). Não foram observadas alterações sugestivas de processo inflamatório nem de proliferação de células estromais. Foi possível observar hiperplasia do epitélio cilíndrico ciliado glandular e do epitélio luminal, sobretudo no momento da primeira intervenção cirúrgica. O epitélio de revestimento luminal do endométrio variou entre indivíduos e entre os procedimentos. Antes da ovariectomia, apresentava majoritariamente células cilíndricas ciliadas pseudoestratificadas, com ocasionais células cúbicas ciliadas. Após a segunda intervenção, o epitélio luminal era composto por uma camada simples de células cúbicas ou pavimentosas (Figuras 4 e 5). As formações císticas encontram-se revestidas por epitélio simples pavimentoso. As espessuras uterinas total, de endométrio e miométrio reduziram mais de 50% em pelo menos 88% das fêmeas em diestro. Foi observada ainda significativa redução do número e da dilatação

glandular no intervalo de seis meses. Os valores médios e desvios padrões das medidas aferidas de cadelas em diestro estão detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Medidas médias e desvio padrão, e características histológicas de cadelas em diestro com hiperplasia endometrial cística, após primeira (S1) e segunda (S2) cirurgias.

Variável	S1	S2	<i>p</i>
<b>Espessura uterina total (µm)</b>	2729.39	1529.11	<0.0001 <sup>#</sup>
	± 221.41	± 202.07	
	2572.55	1274.15	
	(2152.5	(961.75	
	-	-	
	3282.65)	1792.9)	
<b>Diâmetro lúmen (luz + endométrio) (µm)</b>	4175.61	2265.19	<0.0001 <sup>#</sup>
	± 338.54	± 220.97	
	3824.7	2038.75	
	(3455.5	(1680.6	
	-	-	
	4950.45)	2488.65)	
<b>Diâmetro luz uterina (µm)</b>	2469.54	1348.27	0.0002 <sup>*</sup>
	± 330.83	± 175.57	
	2185.2	1005.45	
	(1686.8	(839.65	
	-	-	
	2983.05)	1795.7)	
<b>Altura epitélio endometrial (µm)</b>	13.17 ±	7.37 ±	0.0043 <sup>#</sup>
	1.16	1.11	
	13.4	5.4 (4.4	
	(9.35 -	- 8)	
	15.4)		
	1226.47	541.4 ±	0.0002 <sup>#</sup>
	± 152.62	68.61	
	1062.45	468.05	
	(832.3 -	(392 -	
	1524.25)	519.9)	
	308.62 ±	116.72 ±	0.0021 <sup>*</sup>
	76.77	35.19	
	146	69.4	
	(82.9 -	(48.35 -	
	470.75)	117.3)	
	8.83 ±	6.46 ±	0.0072 <sup>#</sup>
	0.68	0.75	
	8.7 (6.7	6.5 (4 -	
	- 10.15)	7.9)	
<b>Espessura de miométrio (µm)</b>	2048.92	1115.29	<0.0001 <sup>#</sup>
	± 183.19	± 119.02	
	2230.2	1006.2	
	(1325.6	(733.6 -	
	- 2439)	1393.9)	
<b>Classificação do epitélio endometrial (%)</b>			
ECPEC	11,5	11,5	
ECSC	17,5	23,5	
EPS	0	23,5	
ECPEC + ECSC	47,5	11,5	
ECSC + EPS	6	30	
ECPEC + ECSC + EPS	17,5	0	
<b>Hiperplasia do epitélio endometrial (%)</b>			
Presente	41	17	<0,05 <sup>+</sup>

<b>Ausente</b>	59	83
<b>Hiperplasia do epitélio glandular (%)</b>		
<b>Presente</b>	53	17
<b>Ausente</b>	48	83
<b>Distensão Glandular (%)</b>		
<b>Ausente</b>	6,7	42,2
<b>Leve</b>	52	52
<b>Moderada</b>	11,7	5,8
<b>Intensa</b>	29,4	0

\*Wilcoxon rank signed test; #Paired *t* test; +Macnemar test. ECPEC (Epitélio cilíndrico pseudoestratificado ciliado); ECSC (Epitélio cúbico simples ciliado); EPS (Epitélio pavimentoso simples).

Figura 3 - Fotomicrografia de úteros de cadelas em diestro com HEC. Observam-se formações císticas focais (A,C,E) e acentuada lesão cística difusa (F) em endométrio. Percebe-se evidente hiperplasia de estroma e glândulas endometriais (B) e projeção polipoide associada à hiperplasia cística (D)

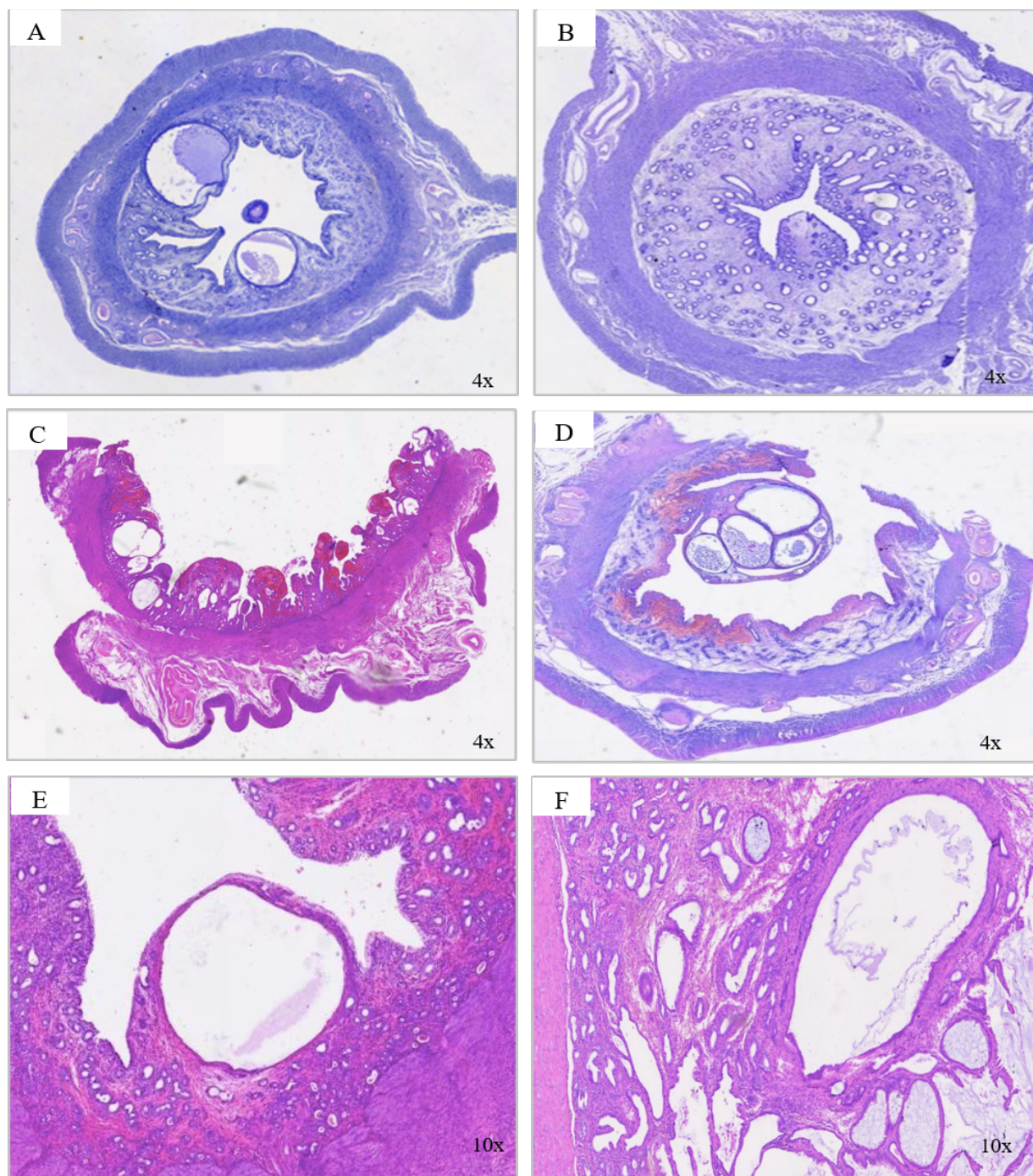


Figura 4 - Fotomicrografia de corno uterino esquerdo de cadelas seis meses após ovariectomia. Observa-se expressiva redução no tamanho e número de glândulas e ausência de grandes estruturas císticas.

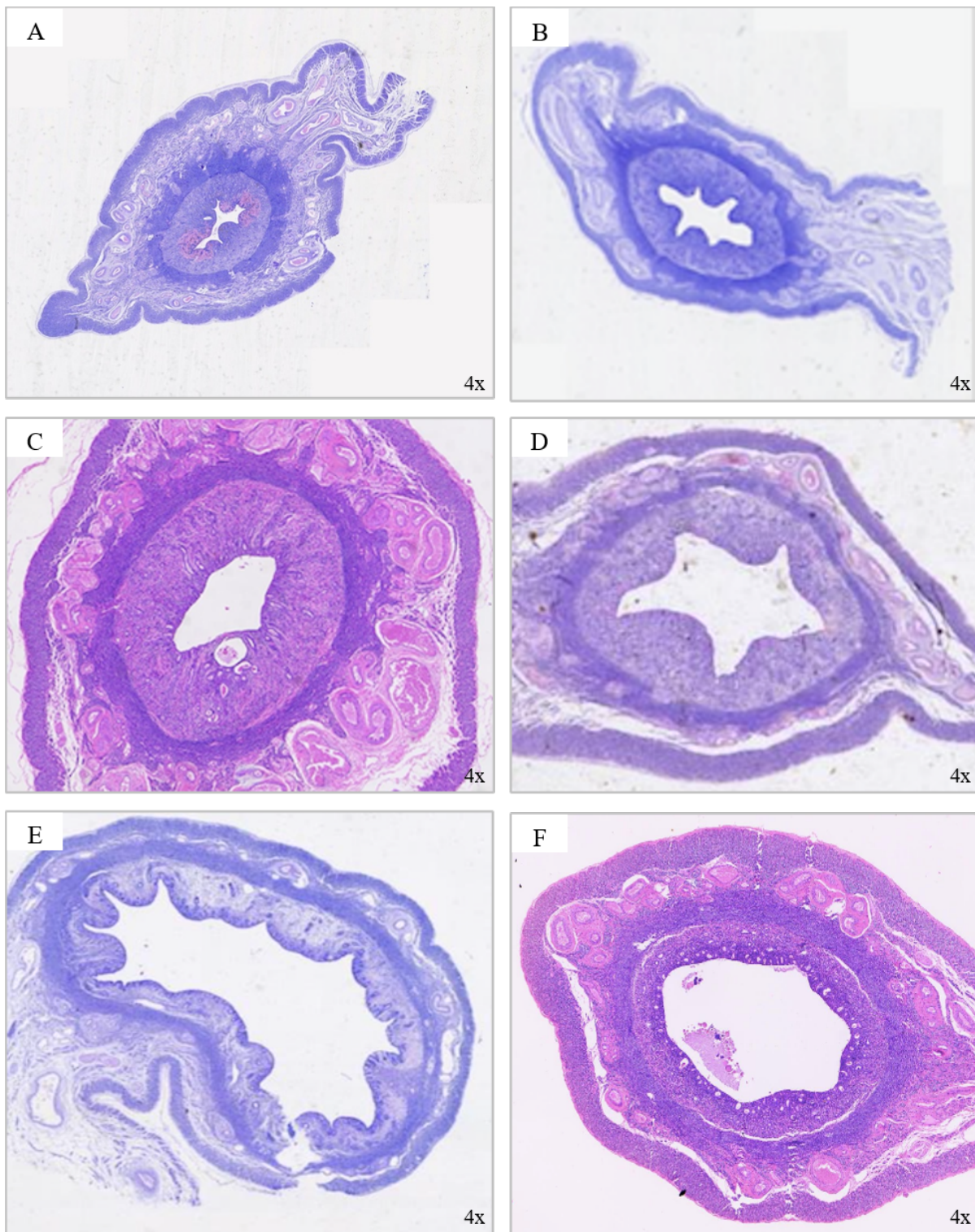
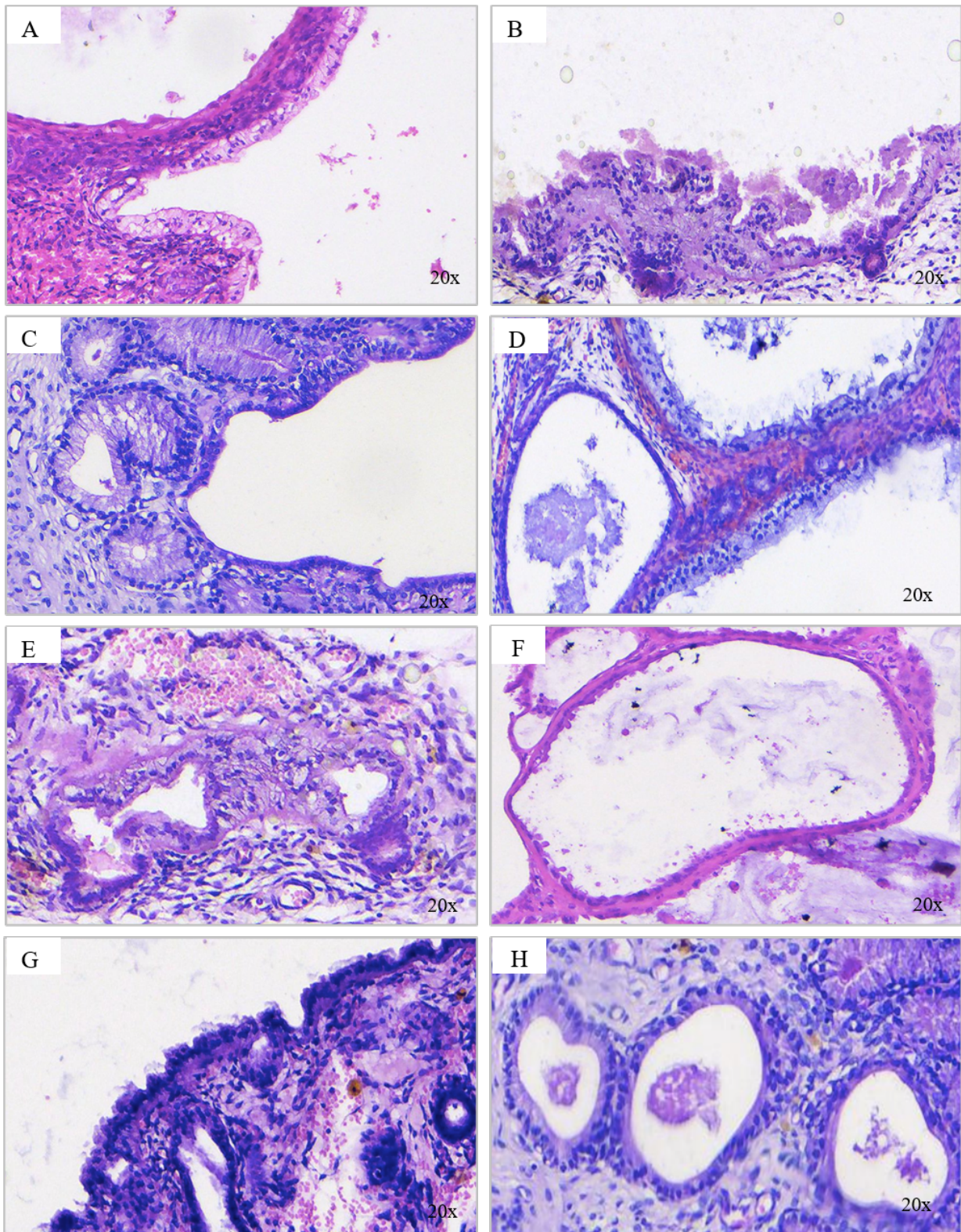


Figura 5 - Fotomicrografia de tecido uterino de cadelas em diestro, com HEC. Observa-se hiperplasia do epitélio endometrial (A, B, C, D) e do epitélio glandular (C, E), além do ECPC luminal (D, G) e ectasia glandular (D, F, H).



### 3.6. Análise imunohistoquímica

Não houve diferença significativa entre os segmentos coletados de um mesmo corno uterino. Os resultados apresentados serão a média entre as três amostras. A análise dos marcadores de receptores de progesterona (RP), receptores de estrógeno (RE) e de Ki-67 demonstrou grande diferença individual entre as cadelas após ambos os procedimentos (Figura 6). A marcação por Ki-67 foi baixa nas duas fases da pesquisa, e esteve presente nas células estromais, do epitélio glandular e do epitélio luminal nos dois momentos (Figura 7). A média de marcação imediatamente após ovariectomia dentre as 17 cadelas em diestro foi de 4,6% (máximo de 12% e mínimo de 2%), e seis meses após, de apenas 2,3% (máxima de 5% e mínima de 0%). Houve redução do percentual de marcação de Ki-67 em 13 cadelas (77%), aumento em três (17%) e manutenção em uma (6%). Quatro cadelas em diestro (23%) tiveram marcação zerada para Ki-67 em células glandulares seis meses após ovariectomia (Figura 6).

Para melhor análise dos marcadores de RE e RP, os resultados serão apresentados através do método semiquantitativo (Tabelas 2 e 3). Houve marcação de RE e RP em células estromais, epitélio glandular e epitélio luminal, após ambos os procedimentos (Figura 7). Das 17 cadelas em diestro, dez (58%) apresentaram redução significativa na marcação de receptores de estrógeno; seis (35%) mantiveram o grau de marcação e uma única cadela (7%), apresentou aumento. Quanto à marcação de receptores de progesterona, 13 (77%) fêmeas em diestro apresentaram importante redução, enquanto quatro (23%) mantiveram o grau de marcação. Nenhum indivíduo apresentou aumento de RP (Figura 6).

Foi demonstrada correlação positiva ( $p < 0,05$ ) entre marcação de receptores esteroidais, ki-67 e grau de HEC.

Tabela 2 - Resumo do método semiquantitativo para análise do escore imunohistoquímico em útero de cadelas para Anti-Pr e Anti-E. Objetiva x40.

CÉLULAS POSITIVAS	ESCORE
>75%	4+
25-75%	3+
10-25%	2+
<10%	1+

Tabela 3 - Número de cadelas em diestro por escore de marcação imunohistoquímica de receptores de progesterona (RP) e estrógeno (RE) no endométrio, na primeira (S1) e segunda (S2) cirurgias.

ESCORE	RE		RP	
	S1	S2	S1	S2
4	6	1	9	2
3	6	2	3	3
2	1	1	3	2
1	4	13	2	10

Figura 6 - Imunomarcação média de fator de proliferação celular ki-67 (A), receptores de estrógeno (B) e receptores de progesterona (C) em cadelas com HEC, em diestro.

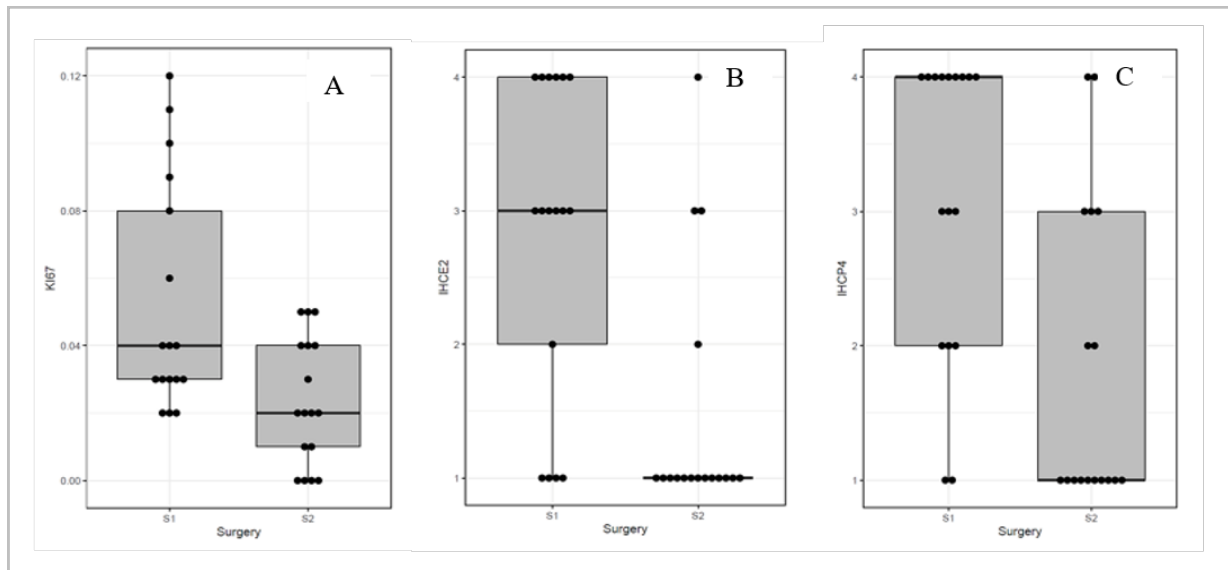
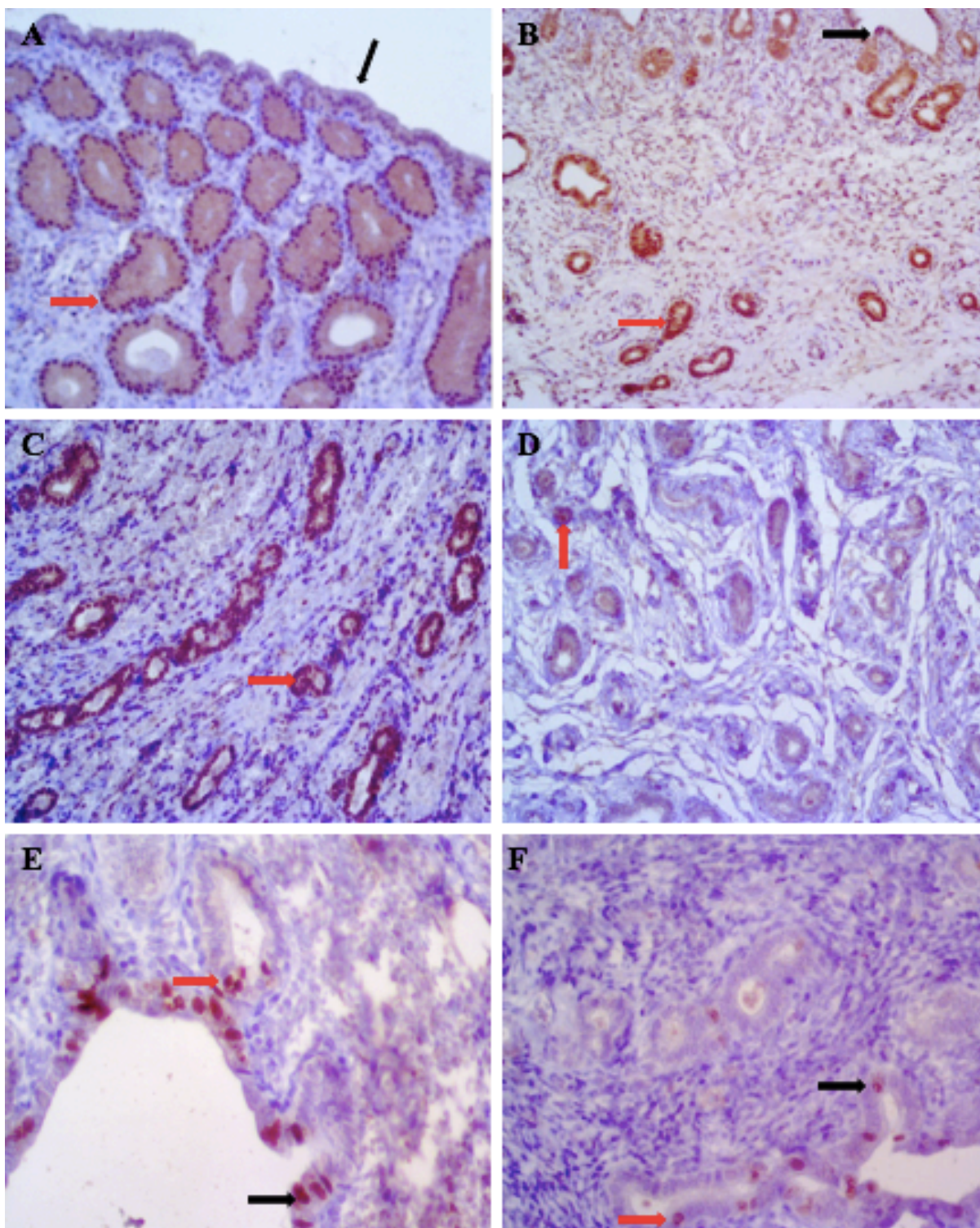


Figura 7 - Fotomicrografia de imunomarcação de receptores de estrógeno (A,B), progesterona (C,D) e Ki-67 (E,F), antes (à esquerda) e seis meses após ovariectomia (à direita). Observa-se marcação nuclear predominantes em células glandulares (setas vermelhas) e células do epitélio luminal (setas pretas).



### 3 DISCUSSÃO

Alterações morfológicas no útero de cadelas com HEC já foram descritas em literatura<sup>[8-10]</sup>. No entanto, dificuldades na caracterização histológica de diferentes alterações de origem proliferativa no endométrio de cadelas persistem. Isso se deve em grande parte por tratar-se de um tecido em constante alteração devido ao dinâmico ciclo estral na espécie, reafirmando a importância do conhecimento histopatológico de tais condições<sup>[8,10]</sup>. A literatura atualmente disponível traz associação dos achados macroscópicos à análise histopatológica do corno uterino de cadelas afetadas por diferentes graus de HEC e piometra<sup>[10]</sup>, mas ainda há falta de consistência entre estudos sobre a manutenção de alterações histológicas e moleculares na ausência de hormônios esteroidais. Faz-se necessária investigação mais criteriosa a respeito de alterações que vão além da morfologia macroscópica. Um estudo investigou o comportamento uterino após a ovariectomia de cadelas em anestro sem alterações endometriais<sup>[19]</sup> e concluiu que há redução, porém não extinção da expressão de fatores de inflamação e proliferação tecidual (Ki-67), receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) após seis meses. Outros autores já demonstraram que é possível instituir um quadro de piometra após a ressecção dos ovários, através da aplicação exógena de progestágenos e estradiol<sup>[3,4,25]</sup>, no entanto Schafer-Somi et al.<sup>[19]</sup> demonstraram através de análises moleculares e imunohistoquímicas a progressão uterina após ovariectomia bilateral.

No presente estudo, demonstra-se a involução estrutural macro e microscópica do grau de hiperplasia endometrial e das alterações morfométricas do tecido uterino acometido por HEC após a ovariectomia (Figuras 8 e 9). Também observa-se a correlação entre a expressão de receptores de hormônios esteroidais e o grau de HEC, e como há significativa redução dos mesmos à medida que há involução endometrial. Verificou-se ainda redução dos níveis de Ki-67 após ovariectomia, sugerindo regressão do estado inflamatório.

Figura 8 - Aspecto ultrassonográfico (A), morfológico macroscópico (B) e histológico (C) de cadela em diestro com HEC grau III. A: Observa-se lúmen uterino (\*) distendido por conteúdo anecogênico de baixa celularidade. Setas brancas indicam paredes uterinas; B: Presença de múltiplos cistos endometriais (seta preta) distribuídos difusamente por toda a superfície, associados à secreção mucosa à discretamente hemorrágica; C: Acentuada lesão cística difusa, com presença de conteúdo mucoso (\*) alterando a arquitetura normal do endométrio (1: serosa; 2: miométrio; 3: endométrio).

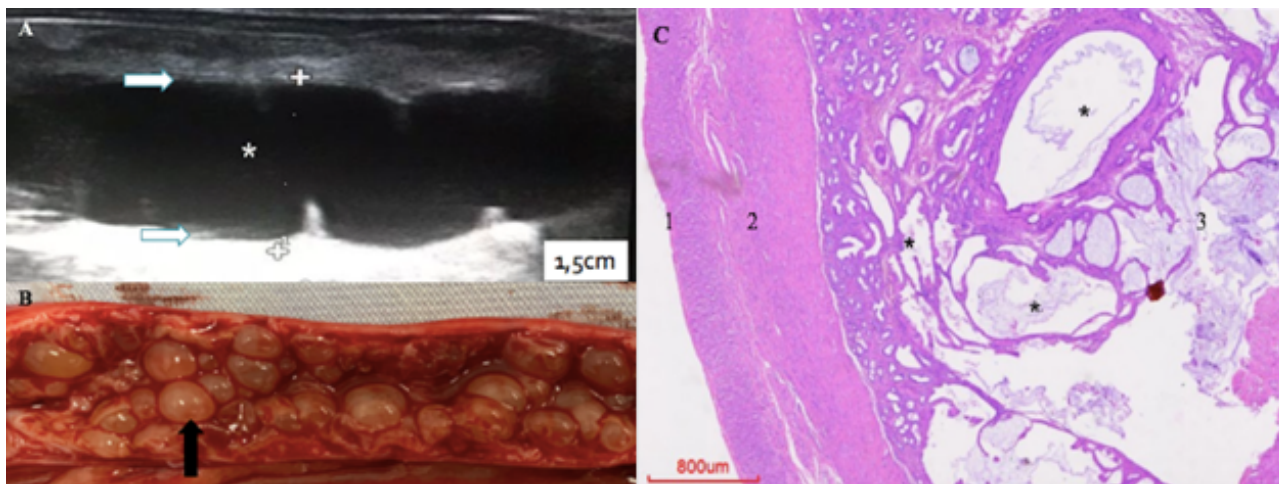
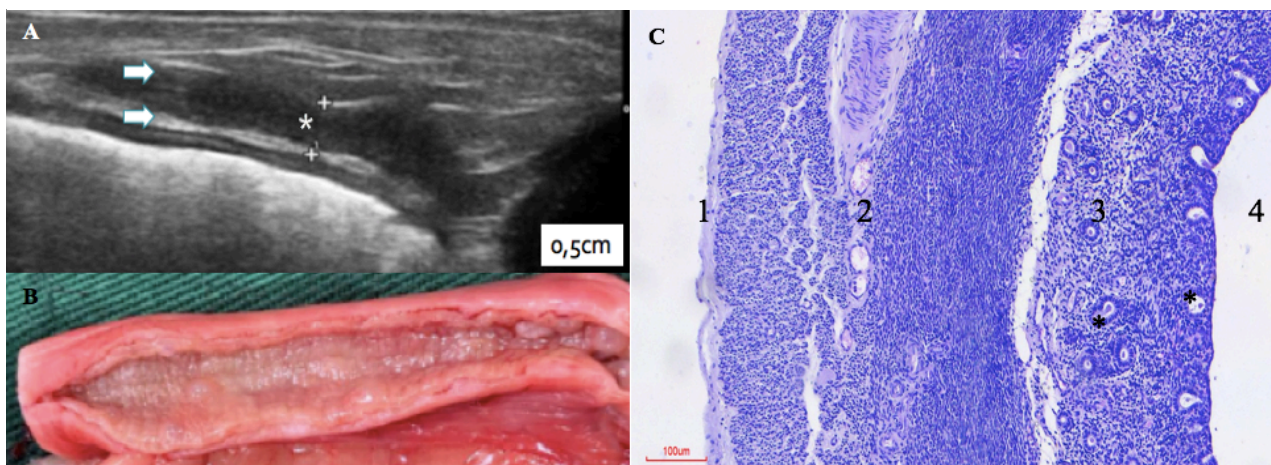


Figura 9 - Aspecto ultrassonográfico (A), morfológico macroscópico (B) e histológico (C) de cadela seis meses após ovariectomia. A: Observa-se lúmen uterino (\*) sem conteúdo. Setas brancas indicam paredes uterinas; B: Ausência de cistos endometriais. Observa-se superfície endometrial lisa e regular, sem secreção; C: Observa-se endométrio sem características hiperplásicas, glândulas sem dilatação evidente (\*) e ausência de estruturas císticas (1: serosa; 2: miométrio; 3: endométrio; 4: lúmen).



Em cadelas com formações císticas visíveis macroscopicamente, observou-se glândulas de diferentes tamanhos, distribuídas difusamente no endométrio, preenchidas por conteúdo mucoso, com achatamento e progressiva atrofia do epitélio naquelas com extrema dilatação. Os achados histológicos apresentados são comparáveis aos encontrados em literatura<sup>[8-11]</sup>. No presente estudo, quatro fêmeas em diestro apresentaram múltiplas formações císticas, com acúmulo de secreção mucosa, hiperplasia do epitélio glandular e perda da estratificação anatômica do tecido endometrial. Tais achados histológicos já foram previamente descritos como HEC de moderado à elevado grau<sup>[11, 21]</sup>. As mesmas cadelas expressaram maior percentual de Ki-67, além de elevada marcação para RE e RP previamente à ovariectomia. Após o segundo procedimento cirúrgico, apresentaram redução significativa do grau de HEC, espessura endometrial e da marcação de ki-67 e receptores hormonais. As fêmeas com HEC leve à moderada apresentaram espessamento endometrial acompanhado por pequenas formações císticas glandulares, em menor quantidade, sem proliferação de células estromais, ou edema endometrial. Essas mesmas cadelas apresentaram valores baixos à intermediários de RE, RP e Ki-67 imediatamente após ovariectomia. Seis meses após, apresentaram redução ou manutenção da marcação imunohistoquímica, assim como do grau de HEC. No entanto apresentaram redução significativa da espessura de endométrio e miométrio, e da hiperplasia de epitélio glandular.

Observou-se significativa marcação dos receptores de ambos os hormônios, porém com maior intensidade em células glandulares e do epitélio luminal, antes da ovariectomia. Verificou-se redução de RE e RP no endométrio das cadelas, com destaque novamente para as células do epitélio glandular, uma vez realizada a ovariectomia, acompanhadas pela involução da hiperplasia endometrial. Estudos anteriores<sup>[24-26]</sup> demonstraram que cadelas com HEC e HEC-P apresentam maiores escores de receptores de hormônios esteroidais, especialmente nas células estromais, quando comparados a cadelas na mesma fase do ciclo estral, sem alterações proliferativas. Schafer-Somi et al<sup>[19]</sup> observaram redução significativa de RE e RP apenas em células estromais seis meses após ovariectomia. Tal divergência entre os estudos pode ser atribuída à diferente fase de ciclo estral das cadelas estudadas. No estudo prévio<sup>[19]</sup>, foram avaliadas cadelas em anestro, sem características de hiperplasia endometrial de qualquer grau, enquanto no presente estudo, foram analisadas cadelas em diestro, com atividade secretória exacerbada pela hiperplasia de glândulas endometriais.

A HEC é uma consequência da dinâmica interação entre estrógeno e progesterona, que provocam desenvolvimento endometrial associada à proliferação glandular e intensifica a atividade secretória das glândulas endometriais<sup>[8,9]</sup>. Verificou-se ainda, a transição do epitélio

superficial do lúmen endometrial, de seu estado secretório e hiperplásico, para estado quiescente. As células cilíndricas ciliadas de organização pseudoestratificada foram substituídas por epitélio simples composto por células cúbicas ou pavimentosas. Essas informações suportam a hipótese do importante papel dos hormônios esteroidais no desenvolvimento da afecção.

Os maiores índices de Ki-67 observados no presente estudo são os das fêmeas em com maior grau de hiperplasia endometrial. Apesar de bem estabelecido quanto ao seu papel em afecções inflamatórias na medicina humana, há pouca literatura disponível sobre Ki-67 no endométrio de cadelas acometidas por HEC. Reusche<sup>[27]</sup> demonstrou que a afecção é acompanhada por uma série de processos desordenados envolvendo proliferação e apoptose celular, que resultam em regeneração endometrial insuficiente, assim como descrito na hiperplasia endometrial em mulheres. Schafer-Somi et al.<sup>[19]</sup> verificou ausência completa da marcação de Ki-67 em células estromais após ovariectomia nas nove cadelas estudadas, enquanto verificamos a ausência completa de Ki-67 em apenas quatro cadelas, no epitélio glandular, seis meses após ovariectomia. Destas, duas apresentavam HEC grau I e as outras duas, HEC grau II, previamente à ovariectomia; seis meses após, apresentavam HEC de grau I com importante redução de espessura do endométrio, da hiperplasia e número de glândulas. Os dados suportam a hipótese de que, à medida que há regressão do grau de HEC, ocorre redução do estado inflamatório e proliferativo, representado pela marcação de Ki-67, e tendência ao retorno do tecido uterino ao estado de quiescência.

Assim como observado anteriormente<sup>[19]</sup>, não houve ausência completa de receptores hormonais, e marcadores de Ki-67 zeraram em apenas quatro cadelas no tecido glandular, seis meses após a ovariectomia. Estes autores<sup>[19]</sup> identificaram redução de aproximadamente 22 e 27% de marcação para receptores de estrógeno e progesterona, respectivamente, em tecido uterino de nove cadelas em anestro após ovariectomia. No presente trabalho, verificou-se uma redução média de 57% da marcação de RE e RP em cadelas em diestro com diferentes graus de HEC. É plausível afirmar que, proporcionalmente, houve uma maior redução de RE e RP no presente estudo do que no apresentado anteriormente. No entanto, Schafer-Somi et al.<sup>[19]</sup> realizaram ovariectomia em cadelas em fase de anestro, quando espera-se que a atuação dos hormônios esteroidais já seja fisiologicamente menor do que em cadelas em diestro, como nas utilizadas em nosso experimento. A nosso conhecimento, não há outros estudos na literatura atual que demonstrem a progressão de receptores de hormônios esteroidais em cadelas após ovariectomia em diferentes fases do ciclo estral, o que impossibilita a comparação entre a proporção de redução dos receptores hormonais.

A HEC é uma condição de caráter degenerativo, progesterona-dependente e pode predispor à piometra<sup>[15,28]</sup>. Anormalidades na expressão de receptores endometriais de hormônios esteroidais levam à uma excessiva secreção e dilatação glandular com acúmulo de conteúdo mucoso e formação de cistos<sup>[29]</sup>. Associada à redução da perfusão sanguínea e da inércia uterina provocadas pelas elevadas concentrações de progesterona, tais fatores favorecem a proliferação bacteriana. Em seis meses, foi possível verificar que a interrupção da influência de hormônios esteroidais levou à regressão, ou à interrupção da progressão da HEC. Nenhuma das cadelas acompanhadas desenvolveu piometra durante o acompanhamento, reafirmando que, na ausência de hormônios esteroidais, a piometra não se estabelece.

Tabela 4 - Resumo de variáveis obtidas por imunohistoquímica, de segmentos uterinos provenientes nas 20 cadelas avaliadas. S1: Ovariectomia + Histerectomia direita; S2: Histerectomia esquerda.

ID	CADELA	FASE CICLO ESTRAL	GRAU HEC S1	GRAU HEC S2	RE (S1)	RE (S2)	RP (S1)	RP (S2)	KI67 (S1)	KI67 (S2)
A1	Taigra	Diestro	2	1	3+	1+	3+	1+	4%	2%
A2	Mel	Diestro	1	1	1+	1+	2+	1+	3%	0
A3	Amiguinha	Anestro	0	0	1+	1+	4+	1+	6%	0
A4	Safira	Diestro	2	1	1+	1+	3+	1+	2%	0
A5	Chimana	Diestro	3	1	4+	1+	4+	1+	10%	5%
A6	Mel	Diestro	2	1	1+	1+	4+	2+	3%	0
A7	Ausa	Diestro	3	2	3+	1+	4+	4+	8%	5%
A8	Nina	Diestro	2	1	4+	1+	4+	3+	3%	1%
A9	Yoga	Diestro	1	1	3+	4+	4+	2+	6%	3%
A10	Filó	Anestro	0	0	4+	1+	3+	2+	0	0
A11	Meg	Diestro	2	0	1+	1+	4+	1+	3%	1%
A12	Meg	Diestro	1	1	4+	1+	4+	4+	4%	5%
A13	Luma	Diestro	1	1	2+	1+	4+	3+	2%	4%
A14	Lola	Diestro	2	1	3+	2+	1+	1+	12%	2%
A15	Kiara	Proestro	0	0	3+	3+	4+	3+	1%	0
A16	Shiva	Diestro	1	1	4+	1+	1+	1+	3%	0%
A17	Nina maria	Diestro	3	1	4+	1+	4+	3+	9%	2%
A18	Mel	Diestro	1	0	3+	3+	3+	1+	2%	4%
A19	Sophia	Diestro	1	0	3+	3+	2+	1+	4%	4%
A20	Luna	Diestro	3	1	4+	1+	2+	1+	11%	2%

Tabela 5 - Resumo de variáveis obtidas de ultrassonografia e evolução histológica das espessuras de parede uterina total, endométrio e miométrio, aferidas nas 20 cadelas avaliadas. S1: Ovariectomia + Histerectomia direita; S2: Histerectomia esquerda.

ID	CADELA	Corno utE (cm) (S1)	Corno utE (cm) (S2)	Espessura uterina total	Espessura endometrial	Espessura miométrio
A1	Taigra	0,93	0,57	Redução	Redução	Redução
A2	Mel	0,66	0,19	Redução	Redução	Redução
A3	Amiguinha	0,4	0,3	Redução	Redução	Redução
A4	Safira	0,48	0,4	Redução	Redução	Redução
A5	Chimana	0,61	0,57	Redução	Redução	Redução
A6	Mel	0,9	0,89	Redução	<b>Aumento</b>	Redução
A7	Ausa	0,78	0,59	Redução	Redução	Redução

A8	Nina	0,64	0,58	Redução	Redução	Redução
A9	Yoga	0,6	0,54	Redução	Redução	Redução
A10	Filó	0,59	0,2	Redução	Redução	Redução
A11	Meg	0,88	0,3	Redução	Redução	Redução
A12	Meg	1,26	0,19	Redução	Redução	Redução
A13	Luma	0,87	0,77	Redução	Redução	<b>Redução</b>
A14	Lola	0,53	0,28	Redução	Redução	Aumento
A15	Kiara	0,44	0,15	Redução	Redução	Redução
A16	Shiva	0,56	0,33	Redução	Redução	Redução
A17	Nina maria	0,59	0,56	Redução	Redução	Redução
A18	Mel	0,81	0,3	Redução	Redução	Redução
A19	Sophia	1,73	0,43	Redução	Redução	Redução
A20	Luna	0,75	0,3	Redução	Redução	Redução

#### 4 CONCLUSÃO

À conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo a apresentar a regressão da hiperplasia endometrial cística em cadelas após ovariectomia. Observa-se evidente redução do de pelo menos 50% da espessura total uterina, do endométrio e miométrio em 88% das fêmeas avaliadas. Há clara redução da imunomarcagem de receptores de estrógeno e progesterona e ki-67 no útero de cadelas com HEC após ovariectomia. Esses fatores evidenciam a tendência uterina de retorno ao estado de quiescência e reafirmam a eficácia da ovariectomia como técnica adequada para castração. Sugere-se que em um período maior de seis meses, o útero das cadelas apresente características semelhantes ao período de anestro. Novos estudos com maior intervalo entre a ovariectomia e histerectomia são necessários para confirmação da hipótese.

#### 5 REFERÊNCIAS


1. Van Goethem B., Schaeffers-Okkens A., Kirpenseijn J. Making a rational choice between ovariectomy and ovariohysterectomy in the dog: a discussion of the benefits of either technique. *Vet Surg.* **35**(2), 136–143 (2006).
2. Yates, D.; Leedham, R. Prepubertal neutering of dogs—some risks and benefits. *Companion Animal.* **24**(1), 38-42 (2019).
3. DeTora, M., & McCarthy, R. J. Ovariohysterectomy versus ovariectomy for elective sterilization of female dogs and cats: is removal of the uterus necessary? *Journal of the American Veterinary Medical Association.* **239**(11), 1409-1412 (2011).
4. Janssens, L. A. A., Janssens, G. H. R. R. Bilateral flank ovariectomy in the dog: surgical

- technique and sequelae in 72 animals. *J small anim pract.* **32**, 249-52 (1991).
5. Moxon, R., Whiteside, H., & Enland, G. C. W. Prevalence of ultrasound-determined cystic endometrial hyperplasia and the relationship with age in dogs. *Theriogenology.* **86**(4), 976–980 (2016).
  6. Hagman R. Molecular aspects of uterine diseases in dogs. *Reprod Dom Anim.* **52**(3), 37–42 (2017).
  7. Rybska, M. *et al.* Expression of Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Canine Endometrium with Cystic Endometrial Hyperplasia–Pyometra Complex. *Animals*, **11**(6),1844 (2021).
  8. Schlafer, D., Gifford, A. Cystic endometrial hyperplasia, pseudo-placentational endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. *Theriogenology*; **70**(3), 349–58 (2008).
  9. Schlafer, D. Diseases of the canine uterus. *Reprod Domest Anim.* **47**(6) 318–22 (2012).
  10. Woźna-Wysocka, M. *et al.* Morphological changes in bitches endometrium affected by cystic endometrial hyperplasia - pyometra complex – the value of histopathological examination. *BMC Vet Res* **17**, 174 (2021).
  11. 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.* **55**(7), 1509–19 (2001).
  12. Smith, F.O. Canine pyometra. *Theriogenology*; **66**(3), 610–2. (2006).
  13. Aparício, M., Vicente, R.R. *Reproduction and Obstetrics in Domestic*. Publisher MedVet, 458p. (2015).
  14. Katkiewicz, M., Boryczko, Z. Structural ovarian changes in bitches with uterus diseases. *Med Weter.* **62**, 311–5. (2006).
  15. Hagman, R. Diagnostic and prognostic markers for uterine diseases in dogs. *Reprod Domest Anim.* **49**(2),16–20. (2014).
  16. Veiga, G. A. L. *et al.* Cystic endometrial hyperplasia-pyometra syndrome in bitches: identification of hemodynamic, inflammatory, and cell proliferation changes. *Biology of reproduction.* **96**(1), 58-69 (2017).
  17. Batista P, Gobello C, Rube A, Corrada Y, Tórtora M, Blanco P. Uterine blood flow evaluation in bitches suffering from cystic endometrial hyperplasia (CEH) and CEH-pyometra complex. *Theriogenology.* **85**(7), 1258-61 (2016)
  18. Leitner, M., Aurich, J., Galabova, G., Aurich, C., Walter, I. Lectin binding patterns in normal canine endometrium and in bitches with pymetra and cystic endometrial

- hyperplasia. *Histology and histopathology*. **18**(3), 787-95 (2003).
19. Schäfer-Somi, S. et al. Morphological, histological and molecular investigations on canine uterine tissue after ovariectomy. *Theriogenology* **102**, 80-86 (2017).
  20. Tolosa E.M.C., Rodrigues C.J., Behmer O.A. & Freitas Neto A.G. *Manual of Techniques for Normal and Pathological Histology*. 2<sup>a</sup> ed. Manole, Barueri. 331 (2003).
  21. Dow C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *J Comp Pathol*. **69**, 237-50. (1959).
  22. Collins, T. J. ImageJ for Microscopy. *BioTechniques*, **43**(1), S25–S30. (2007).
  23. Schotanus, B., De Gier, J., Van Der Lugt, J. and Okkens, A. Estriolium Treatment in the Bitch: A Risk for Uterine Infection? *Reproduction in Domestic Animals*, **43**(3), 176-180. (2008).
  24. De Bosschere H, Ducatelle R, Tshamala M: Uterine oestrogen and progesterone receptor expression in experimental pyometra in the bitch. *J Comp Pathol*. **128**(2-3), 99-106 (2003).
  25. 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. *Anim Reprod Sci*. **70**(3-4), 251-259 (2002).
  26. De Cock, H.; Vermeirsch, H.; Ducatelle H.; De Schepper J. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cist-endometritis- pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, **48**(6), 1035-1047 (1997).
  27. Reusche N. *et al*. Proliferative and apoptotic changes in the healthy canine endometrium and in cystic endometrial hyperplasia. *Theriogenology*. **1**(114), 14-24 (2018).
  28. Voorwald FA, *et al*. Molecular Expression Profile Reveals Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Canine Endometrial Lesions. *PLoS ONE* **10**(7), e0133894. (2015).
  29. Hadiya H.D. Patel D.M. Ghodasara D.J. & Bhanderi B.B. Canine Pyometra: Clinico-diagnostic, Microbial, Gross and Histopathological Evaluation. *Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*. **17**(3), 41–45. (2021).

## 7. ANEXOS

### 7.1. Anexo I

 Universidade Federal de Viçosa	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
<b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA</b> <i>Campus Universitário – Viçosa, MG, Brasil, 36570-900 – Telefone: (31) 3612-2315</i>	
<b>CERTIFICADO</b>	
<p>Certificamos que a proposta intitulada “<b>Avaliação de aspectos morfológicos, histológicos e biomoleculares em útero de cadelas adultas com hiperplasia endometrial cística após ovariectomia</b>”, registrada com o nº <b>31/2022</b>, sob a responsabilidade da Professora Fabiana Azevedo Voorwald do Departamento de Veterinária, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08/10/2008, do Decreto nº 6.899, de 15/07/2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa, em <b>14/12/2022</b>. Após a conclusão do projeto, o relatório final deverá ser submetido à CEUA para emissão de certificado definitivo.</p>	

## 7.2. Anexo II

9/21/24, 4:42 PM		SisPPG - Sistema de Pesquisa e Pós-Graduação	
		<b>Ministério da Educação</b> <b>Universidade Federal de Viçosa</b> <b>Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação</b>	
Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-900 - Telefone: (31), E-mail: secretaria.ppg@ufv.br			
<b>AVALIAÇÃO DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS, HISTOLÓGICOS E BIOMOLECULARES EM ÚTERO DE CADELAS ADULTAS COM HIPERPLASIA ENDOMETRIAL CÍSTICA SUBMETIDAS A OVARIECTOMIA.</b>			
Projeto registrado conforme dados a seguir. Para verificar a sua autenticidade, acesse <a href="http://www.sisppg.ufv.br">www.sisppg.ufv.br</a> . No campo "Número de registro", informe o número 50559278591 e clique em consultar.			
Número do Projeto:	208593		
Número de Registro:	50559278591		
Data de Registro:	23/01/2023		
Revisão:	Não		
Modalidade do Projeto:	Projeto Autônomo		
Projeto envolve Organismo Geneticamente Modificado?	Não		
Projeto envolve Pesquisa com Seres Humanos?	Não		
Projeto envolve Pesquisa com Animais?	Sim → Protocolo de registro do projeto na CEUA: 31/2.022		
Projeto Relacionado a Treinamento?	Sim		
Modalidade do Projeto Relacionado a Treinamento:	Mestrado		
Título do Projeto:	AVALIAÇÃO DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS, HISTOLÓGICOS E BIOMOLECULARES EM ÚTERO DE CADELAS ADULTAS COM HIPERPLASIA ENDOMETRIAL CÍSTICA SUBMETIDAS A OVARIECTOMIA.		
Palavras Chaves:	Involução uterina, ovariectomia, ovariectomia, HEC		
Grupo de Pesquisa do CNPq Certificado pela UFV:	Controle, métodos de diagnóstico e tratamento de afecções clínicas e cirúrgicas em animais doméstico		
Área de Conhecimento (CNPq):	Ciências Agrárias - Medicina Veterinária - Clínica e Cirurgia Animal		
Linha de Pesquisa:	Métodos Clínicos, Cirúrgicos e Anestésicos Aplicados aos Animais		
Resumo dos Objetivos:	Objetiva-se com esse trabalho, acompanhar o comportamento macroscópico uterino através de exame ultrassonográfico, além de comparar índice de resistividade da artéria uterina antes e após o procedimento de ovariectomia em cadelas adultas diagnosticadas com Hiperplasia Endometrial Cística. Espera-se realizar avaliações por histologia e imunohistoquímica para caracterização histológica e molecular, respectivamente, do útero após o procedimento de ovariectomia, para avaliar influência dos hormônios endógenos sobre o tecido uterino e receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP), além de marcadores de inflamação e proliferação tecidual (Ki67). Ainda para fins comparativos, serão realizados exames colpocitológicos e mensurações séricas de Estradiol e Progesterona antes e após o procedimento. Por fim, propõe-se avaliar o desfecho de útero hiperplásico após a remoção das fontes endógenas de progesterona e estradiol. Adota-se a hipótese de que ocorrerá involução uterina e retorno às características macroscópicas compatíveis com período de anestro após o procedimento de ovariectomia, sem que ocorram complicações pela manutenção		