

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA

CAMILA IMPERICO RIBOLDI

**ACHADOS MICROBIOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS EM PIOMETRA DE
ANIMAIS DE COMPANHIA**

Porto Alegre

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**ACHADOS MICROBIOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS EM PIOMETRA DE
ANIMAIS DE COMPANHIA**

Autor: Camila Imperico Riboldi

**Trabalho apresentado à Faculdade
de Veterinária como requisito
parcial para a obtenção da
graduação em Medicina
Veterinária**

**Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Franciele
Maboni Siqueira**

PORTO ALEGRE

2018/2

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar o presente trabalho principalmente para os profissionais que me auxiliaram na realização do mesmo. A minha orientadora, Professora Franciele Maboni Siqueira, que desde o início do meu período de aprendizado no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRGS (LaBacVet) tem me ensinado, preparado e apoiado para todos os projetos e desafios que apareceram. Obrigada por sempre ter acreditado e investido o teu tempo em mim, e por ser uma profissional diferenciada, que preza por excelência. Aos meus colegas do LaBacVet por sempre me apoiarem.

Ao Setor de Patologia Veterinária da UFRGS, que me deu o auxílio para a execução das lâminas histológicas e para o ensaio imuno-histoquímico. Aos Professores David Driemeier e Welden Panziera obrigada pelo apoio e ensinamentos, e Cíntia De Lorenzo obrigada por todo o suporte e preparo das lâminas histológicas. Obrigada pelos veterinários que me cederam às amostras utilizadas. Obrigada pelo carinho e apoio dos meus pais, amigos, colegas e companheiro.

RESUMO

A piometra é uma infecção uterina que acomete fêmeas de diferentes espécies animais. A doença ocorre em fêmeas não castradas devido ao constante estímulo hormonal desencadeado a cada ciclo estral, principalmente do hormônio progesterona. Tal estímulo pode levar a hiperplasia endometrial cística (HEC). A HEC quando combinada com uma invasão bacteriana pode levar à formação do quadro da piometra. São relatados diversos gêneros bacterianos associados à piometra em animais de companhia, mas a espécie mais frequentemente isolada é *Escherichia coli*. Sabe-se que para a formação da piometra é necessário que ocorra a associação da HEC com uma invasão bacteriana, contudo, a patogenia da doença ainda não foi totalmente compreendida. O presente trabalho hipotetiza que com a observação microscópica da lesão uterina, análise dos achados macroscópicos identificação bacteriana, pode-se compreender melhor a patogenia bacteriana envolvida na doença. Por isso, o objetivo do presente trabalho é associar os achados bacteriológicos, macroscópicos e microscópicos, para melhor compreender a patogenia da doença, pela identificação microbiológica do conteúdo uterino, observação histológica e macroscópica de casos de piometra. A espécie *E. coli* foi a mais observada nas análises microbiológicas dos conteúdos intrauterinos, sendo que nesses casos também foi associado um grau mais severo nas lesões histopatológicas. À análise imuno-histoquímica foi possível confirmar a capacidade de *E. coli* de adesão e invasão ao epitélio uterino. Outros gêneros bacterianos foram também isolados dos conteúdos intrauterinos, como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp., os quais foram associados a lesões menos severas na microscopia. Levando em conta os fatores de virulência bacterianos descritos nos gêneros identificados, nós associamos a severidade das lesões possivelmente a mecanismos de indução de resposta inflamatória, invasão e necrose tecidual. Estes resultados trazem informações importantes quanto aos mecanismos de estabelecimento e desenvolvimento das lesões por *E. coli* no epitélio endometrial em casos de piometra.

Palavras chave: *Escherichia coli*, isolados bacterianos, fatores de virulência, patogenia, histologia

ABSTRACT

Pyometra is a uterine infection that affects females of different species of animals. The disease occurs in non-castrated females due to the constant hormonal stimulation triggered at each estrous cycle, especially by the hormone progesterone. This hormonal stimulus may lead to cystic endometrial hyperplasia (CEH). CEH, when combined with a bacterial invasion, can lead to pyometra. Several bacterial genera are associated with pyometra in domestic companion animals, but the most frequently isolated species is the *Escherichia coli*. For the occurrence of pyometra, the association of CEH with a bacterial invasion is necessary, however, the pathogenesis of the disease has not been fully understood. This study hypothesized that with a microscopic examination of the uterine lesion, analysis of macroscopic findings and bacterial identification, we may better understand the bacterial pathogenesis involved in the disease. Therefore, the aim of the present work is to associate the bacteriological, macroscopic and microscopic findings to better understand the pathogenesis of the disease with the microbiological identification of the uterine contents, histological and macroscopic observation of cases of pyometra. The *E. coli* was the most observed species in microbiological analysis of intrauterine contents, and in these cases, a more severe degree was also associated with histopathological lesions. Immunohistochemical analysis confirmed the ability of *E. coli* to adhere to and invade the uterine epithelium. Other genera were isolated from the intrauterine contents, such as *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp., which presented less severe lesions on microscopy. Taking into account the bacterial virulence factors described in the identified genera, we associate lesion severity possibly with mechanisms of induction of inflammatory response, invasion and tissue necrosis. These results provide important information regarding the mechanisms of establishment and development of *E. coli* lesions in the endometrial epithelium in cases of pyometra.

Keywords: *Escherichia coli*, bacterial isolates, virulence factors, pathogenesis, histology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cultivo bacteriano com o isolamento de <i>Escherichia coli</i>	17
Figura 2 – Gráfico ilustrando a identificação bacteriana dos conteúdos uterinos de caninos acometidos por piometra.....	18
Figura 3 – Gráfico ilustrando a identificação bacteriana em conteúdos intrauterinos de felinos acometidos por piometra.....	19
Figura 4 - Aspecto macroscópico dos úteros e do conteúdo intrauterino.....	20
Figura 5 – Gráfico com a classificação dos conteúdos intrauterinos dos caninos.....	20
Figura 6 – Gráfico com a classificação dos conteúdos intrauterinos dos felinos.....	21
Figura 7 - Lâminas histológicas ilustrando estruturas uterinas e ovarianas do grupo controle.....	22
Figura 8 - Lâminas histológicas ilustrando estruturas uterinas de animais de companhia com piometra.....	24
Figura 9 - Gráfico com os resultados da classificação das amostras de acordo com a severidade dos achados histopatológicos.....	25
Figura 10 - Lâminas histológicas ilustrando estruturas ovarianas de animais de companhia.....	25
Figura 11 - Lâminas histológicas uterinas marcadas com o ensaio imuno-histoquímico...27	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 METODOLOGIA	16
3.1 Isolamento Microbiológico	16
3.2 Macroscopia	17
3.3 Microscopia	17
3.4 Imuno-histoquímica	17
4 RESULTADOS	18
4.1 Achados Microbiológicos	18
4.2 Achados Macroscópicos	20
4.3 Achados Microscópicos	23
4.4 Ensaio Imuno-histoquímico	28
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O complexo hiperplasia endometrial cística (HEC)/piometra ocorre na fase do diestro, pelo estímulo hormonal, simultaneamente com uma infecção bacteriana uterina. É uma doença que acomete diferentes espécies animais, incluindo animais domésticos de companhia, como caninos e felinos fêmea (LYLE, 2015). A HEC é uma resposta exagerada do endométrio (FELDMAN, 2014), sendo uma alteração patológica progressiva uterina (LYLE, 2015). Acomete principalmente fêmeas mais velhas, sendo que em caninos a idade mais comum de ocorrência é superior a seis anos (FELDMAN, 2014; LYLE, 2015) e em felinos é próximos aos cinco anos (HAGMAN, 2018), principalmente pelo estímulo hormonal da progesterona (FELDMAN, 2014). Apesar de ser uma doença mais estudada em fêmeas da espécie canina, o processo de desenvolvimento da piometra em felinos é similar ao que ocorre em caninos (HAGMAN, 2018).

A puberdade em caninos fêmea ocorre entre os seis e 18 meses de idade, e o ciclo estral completo tem uma duração de três meses. Após esse período, a fêmea entra na fase do anestro. As fases que compõe o ciclo estral são: proestro, estro e diestro ou metaestro. No proestro, o ovário irá produzir predominantemente estradiol, tornando a fêmea receptiva ao macho. Alterações fisiológicas ocorrem, como hiperemia e edema de vulva, abertura da cérvix, corrimento vaginal, entre outros. Após esse período, inicia o processo da ovulação, com a fase do estro. Seguido da ovulação, inicia o período do diestro, com aumento da secreção de progesterona mediada pelos corpos lúteos presentes nos ovários (SCHAEFERS-OKKENS, 2014).

A progesterona pode ficar elevada em cadelas durante nove a 12 semanas após a fase estral, caracterizando o diestro. Tal elevação aumenta as secreções uterinas, propiciando um ambiente adequado para a instalação de uma infecção bacteriana. O estrogênio em concentrações altas também pode levar ao desenvolvimento da piometra, principalmente em casos de administração exógena (FELDMAN, 2014; HAGMAN, 2018). Sabe-se que ocorre o envolvimento hormonal e bacteriano para que ocorra a piometra, mas sua patogenia ainda não é totalmente compreendida (HAGMAN, 2018).

Durante a fase do proestro e do estro é normal que ocorra a contaminação bacteriana uterina em animais saudáveis (FELDMAN, 2014), pois na fase estral as bactérias podem ascender pela abertura da cérvix (LYLE, 2015). Os principais sinais clínicos de animais acometidos pela piometra são depressão, anorexia, vômitos, poliúria,

polidipsia, distensão abdominal e a presença do corrimento vaginal, sendo o diagnóstico realizado principalmente por exames de imagem, como radiografia e ultrassonografia (LYLE, 2015).

A ovarioossalpingo-histerectomia (OSH) é o tratamento de eleição em casos de piometra (FELDMAN, 2014; LYLE, 2015). Complicações como toxemia e septicemia são comuns, e nesses casos, apenas a OSH corrigirá o quadro. O tratamento clínico não é preconizado em casos de piometra (FELDMAN, 2014).

A espécie bacteriana mais frequentemente associada em casos de piometra é a *Escherichia coli*, contudo, outros gêneros também podem ser isolados, como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., entre outros (FELDMAN, 2014, HAGMAN, 2018).

A espécie *E. coli* é o isolado mais frequente em piometras de animais domésticos de companhia. Em caninos, pode chegar a 90% dos isolados obtidos do conteúdo intrauterino (GYLES *et al.*, 2010; FRANSSON *et al.*, 1997, HAGMAN, 2018), enquanto que em gatas pode chegar a 71% dos isolados (HAGMAN, 2018). *E. coli* é dividida em patotipos diarreicogênicos e em patotipos extraintestinais. As extraintestinais são causadoras de doenças em diversos sítios, incluindo o trato reprodutivo (GYLES *et al.*, 2010). Normalmente as cepas patogênicas ascendem em direção ao útero por estarem presentes na região anal do animal (HAGMAN, 2018). Foi identificado que *E. coli* causadoras da piometra frequentemente são as mesmas encontradas na flora intestinal normal de cadelas e também no trato urinário das mesmas, quando ocorre uma infecção no trato urinário inferior simultaneamente à infecção uterina (HAGMAN *et al.*, 2002). As *E. coli* causadoras de piometra são denominadas EmPEC (*endometrial pathogenic E. coli*) (dados não publicados).

A maioria dos sorotipos de *E. coli* são comensais de hospedeiros mamíferos, sendo apenas uma pequena parte deles considerada patogênica. Para que possam causar doença, a espécie carrega diversos fatores de virulência (GYLES *et al.*, 2010). Os fatores de virulência descritos na espécie conferem a capacidade de colonizar um sítio, provocando uma infecção pelo uso de mecanismos específicos, como provocar reação inflamatória, ocasionar morte celular, aderir em componentes celulares e extracelulares, entre outros.

Os componentes da célula bacteriana da *E. coli* podem atuar como fatores de patogenicidade. Entre eles, os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa da parede celular bacteriana, e atuam como endotoxinas quando são liberados pela bactéria,

provocando uma severa reação inflamatória, pois as células do estroma uterino aumentam a secreção de interleucina 8 (IL-8) (KARLSSON *et al.*, 2015). A IL-8 é uma citocina cuja principal função é atrair células de defesa como neutrófilos, e ocasiona o aumento da expressão de moléculas responsáveis pela adesão por células endoteliais (VARELLA *et al.*, 2001). Outro componente celular é a cápsula, que é um importante fator para a sobrevivência de *E. coli* extraintestinais, pois ela é antigênica, promovendo a proteção bacteriana contra a fagocitose (MOXLEY, 2016).

As adesinas são proteínas da membrana externa da célula bacteriana, que são essenciais para ocasionar a infecção, pois provocam a aderência da bactéria em um determinado componente do hospedeiro, ou adesão entre as próprias células bacterianas, promovendo a colonização. Uma adesina importante da espécie *E. coli* é a adesina do tipo fímbria S, que facilita a disseminação bacteriana pelos tecidos do hospedeiro (RIBEIRO *et al.*, 2016). Outra adesina, a fímbria P, é importante para promover a adesão e colonização bacteriana no endométrio e no urotélio (WULLT *et al.*, 2003) assim como a fímbria tipo 1 (KREKELER *et al.*, 2012) que tem a capacidade de aderir em diferentes tipos de células do hospedeiro (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Algumas proteínas de superfície podem atuar como adesinas, como a proteína específica uropatogênica (Usp), que já foi identificada em *E. coli* provenientes de infecções uterinas (RIBEIRO *et al.*, 2016), e que pode contribuir para a capacidade de causar infecção pela bactéria. *In vitro* já foi demonstrado que ela tem a capacidade de clivar o DNA, e pelo dano provocado, pode induzir a apoptose celular (NIPIC *et al.*, 2013).

Algumas toxinas exercem um papel fundamental na patogenicidade bacteriana, como o fator de necrose celular 1 (Cnf-1), que induz a reorganização dos microfilamentos de actina presentes no citoesqueleto das células eucariotas, ocasionando a apoptose celular e facilitando a invasão bacteriana (EMÖDY *et al.*, 2003). O fator de necrose citotóxica provoca a deformação da célula do hospedeiro, tornando-as achatadas e multinucleadas, promovendo a liberação de fatores pró-inflamatórios (MOXLEY, 2016).

A alfa-hemolisina é outra toxina relatada na espécie *E. coli*, sendo uma hemolisina que provoca a formação de poros em membranas celulares, como a de eritrócitos, causando uma beta-hemólise. Além disso, causa a lise de granulócitos e dificulta a atividade de neutrófilos, que podem liberar fatores pró-inflamatórios e, ainda, ocasiona a disponibilização o ferro presente do interior da hemácia, em decorrência da hemólise, disponibilizando-o para o uso bacteriano (MOXLEY, 2016). Com a presença da alfa-

hemolisina, a *E. coli* pode promover a destruição tecidual no hospedeiro (HENRIQUES *et al.*, 2016; MOXLEY, 2016) e promover a passagem bacteriana pela barreira epitelial (MOXLEY, 2016). Estudos demonstram que as cepas isoladas de amostras de piometra são normalmente hemolíticas (GYLES *et al.*, 2010), sendo que tanto a presença de hemolisinas quanto o Cnf-1 podem provocar a destruição de células eucariotas (SIQUEIRA *et al.*, 2009).

O gênero *Staphylococcus* spp. também é isolado em infecções uterinas, tendo uma ocorrência menor que a espécie *E. coli* e possuindo escassos relatos, podendo chegar a 2-15% em caninos fêmeas e 8% em felinos (HAGMAN, 2018). O gênero *Staphylococcus* spp. é representado por bactérias piogênicas, ou seja, que causam lesões supurativas, e que possuem diversos fatores de virulência descritos (QUINN *et al.*, 2005). São bactérias encontradas nas superfícies de todos os animais de sangue quente (SMELTZER *et al.*, 2016).

Diversas toxinas podem ser produzidas pelo gênero, entre elas as citotoxinas leucocidina, e hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), que danificam a membrana celular de diferentes tipos celulares. Outra toxina muito descrita no gênero é a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), que promove a liberação de citocinas inflamatórias (BENITES *et al.*, 2016).

Os constituintes da estrutura celular podem atuar na patogênese da infecção por *Staphylococcus*. Os componentes de parede, como peptidoglicano, ácido teicoico, e ácido lipoteicoico, estimulam o sistema imune do hospedeiro, ocasionando uma reação inflamatória. Proteínas de superfície, como a proteína A, atuam inibindo a opsonização. A cápsula presente no gênero atua protegendo as células bacterianas da fagocitose e inibe o processo de quimiotaxia (BENITES *et al.*, 2016).

Algumas enzimas também são sintetizadas pelo gênero *Staphylococcus* spp., como a hialuronidase que provoca a hidrólise do ácido hialurônico e proteases que hidrolisam proteínas presentes no hospedeiro. Uma enzima muito importante para a patogenicidade é a coagulase, que promove a coagulação do plasma sanguíneo (BENITES *et al.*, 2016), e auxilia na proteção das células bacterianas contra as células fagocitárias. A catalase é outra importante enzima, que proporciona a sobrevivência bacteriana quando fagocitada por células de defesa do hospedeiro (BENITES *et al.*, 2016).

A bactéria do gênero *Streptococcus* spp. também é associada em casos de infecções endometriais nos animais domésticos e em humanos, mas poucos estudos relatam o gênero

em piometras de animais de companhia. A ocorrência de *Streptococcus canis* observada em infecções uterinas é de 7,46% (KRUGER *et al.*, 2010), enquanto outros estudos mostram que o gênero *Streptococcus* spp. ocorre em piometras de caninos entre 4-23% dos casos e, em gatas, pode alcançar de até 19% dos casos (HAGMAN, 2018).

As bactérias do gênero *Streptococcus* spp. são associadas a lesões do tipo piogênicas, acometendo diversos órgãos dos mamíferos, entre eles o trato reprodutivo (STEWART, 2016). A patogenicidade do gênero é ocasionada pela ação de diversos fatores de virulência, como adesinas, toxinas e enzimas. As adesinas conferem a capacidade de fixar as células bacterianas em componentes do hospedeiro, também podendo atuar evitando a fagocitose e estimulando uma reação inflamatória (MELVILLE *et al.*, 2016).

Existem diversas adesinas descritas dentro do gênero, entre elas a proteína M, que liga a bactéria especificamente ao fibrinogênio (proteína precursora da fibrina no processo de coagulação). Ela também possui atividade antifagocitária, protegendo as células bacterianas, sendo um dos principais e mais importantes fatores de virulência do gênero (STEWART, 2016). Outra adesina é a proteína F, que é responsável pela ligação com a fibronectina, promovendo a fixação e internalização das células bacterianas (STEWART, 2016). A proteína C ou antígeno C atua principalmente como adesina, tendo capacidade antigênica e garantindo a resistência à fagocitose (MELVILLE *et al.*, 2016). Existem ainda diversas adesinas relatadas no gênero *Streptococcus* spp., tendo como principal função a ligação da célula bacteriana ao hospedeiro (STEWART, 2016).

Os componentes celulares do gênero *Streptococcus* spp. também atuam como fatores de virulência. A cápsula existente em alguns sorotipos de *Streptococcus* é considerada como um importante fator de virulência. A parede celular presente no gênero *Streptococcus* spp. possui componentes como o ácido lipoteicoico, peptidoglicanos, que em contato com o macrófago provocam a liberação de citocinas pró-inflamatórias (STEWART, 2016). Também, existem diversas toxinas relatadas no gênero entre elas o superantígeno da toxina pirogênica estreptocócica. Essa toxina tem a capacidade de ligar-se as células de defesa do hospedeiro, especificamente os linfócitos T, levando a liberação de altas quantidades de citocinas inflamatórias (STEWART, 2016), gerando quadros clínicos muito graves. Por fim, outras importantes toxinas são as estreptolisina O e estreptolisina S, que são citolisinas que ocasionam a lise de células de defesa, como

neutrófilos, macrófagos e plaquetas (STEWART, 2016), além da lise de hemácias, sendo hemolíticas (MELVILLE *et al.*, 2016).

Levando em conta a diversidade de possíveis micro-organismos que podem estar presentes nos quadros de piometra, e o pouco conhecimento que existe até o momento sobre a patogênese desta infecção, acreditamos que a geração de conhecimentos relacionando a associação entre as lesões causadas e as bactérias envolvidas nos quadros clínicos, ajudará a elucidar a patogenia bacteriana envolvida na piometra. Dessa forma, o presente estudo comparou os achados macroscópicos, microscópicos e bacteriológicos de piometras de animais de companhia. Foi demonstrado que a espécie *E. coli* é mais prevalente em casos de piometra e apresenta o maior grau de severidade das lesões uterinas. Além disso, outros gêneros bacterianos foram encontrados, como *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., sendo associados com lesões histológicas de menor gravidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é melhor compreender a patogenia bacteriana envolvida na piometra, pela análise comparativa dos achados bacteriológicos, microscópicos e macroscópicos.

2.2 Objetivos específicos

- Coletar o útero e os ovários retirados de caninos e felinos fêmea diagnosticados clinicamente com piometra, removidos durante OSH;
- Realizar uma análise bacteriológica do conteúdo intrauterino obtidos dos úteros coletados;
- Realizar classificação macroscópica dos conteúdos purulentos;
- Analisar as lesões histopatológicas dos úteros e ovários;
- Correlacionar os achados bacteriológicos, macroscópicos e microscópicos;
- Realizar estudos sobre os principais fatores de virulência que possam estar envolvidos na patogenia da piometra;
- Realizar a técnica de imuno-histoquímica em lâminas selecionadas com o isolamento de *E. coli*.

3 METODOLOGIA

Foram recebidas no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRGS (LaBacVet) 30 amostras de conteúdo intrauterino, útero e ovário de fêmeas domésticas de companhia que foram diagnosticados com piometra. No total das 30 amostras, 23 eram de caninos fêmeas e sete de felinos fêmeas. Os animais foram diagnosticados com piometra e submetidos ao procedimento de ovariossalpingo-histerectomia para resolução da infecção. Os casos foram provenientes de clínicas particulares da cidade de Porto Alegre/RS. No transcirúrgico foi realizada a punção do conteúdo intrauterino, utilizando uma agulha acoplada a uma seringa, ambas estéreis, garantido que não ocorresse contaminação das amostras, sendo encaminhadas imediatamente ao LaBacVet, sob refrigeração. Já no laboratório, os métodos foram divididos em: i) isolamento microbiológico; ii) microscopia; e iii) macroscopia.

Foi composto um grupo de controles negativos, onde foram utilizados oito amostras de animais provenientes de castração eletiva. O grupo foi composto de cinco caninos fêmeas e cinco felinos fêmeas. Os animais foram submetidos à castração eletiva em clínicas particulares da cidade de Porto Alegre, e já estavam em idade reprodutiva. As amostras passaram pela mesma metodologia a seguir descrita.

3.1 Isolamento Microbiológico

As amostras de conteúdo intrauterino foram recebidas no LaBacVet, sendo imediatamente identificadas e processadas. O processo de identificação bacteriana iniciou-se com a inoculação do conteúdo intrauterino presente na seringa estéril em Ágar Sangue ovino 5% e em Ágar MacConkey, sendo os dois meios de cultivo usuais para isolamento de bactérias. Ambos meios de cultivo foram incubados à 37°C durante 24 horas em aerobiose. Posteriormente, foi feita a identificação dos isolados presentes por métodos bioquímicos adequados conforme descrito por Quinn *et al.* (1994). Em um dos isolados foi utilizado o kit API 20E (Analytab Products/ bioMérieux) para chegar-se a conclusão da identificação dos mesmos. Todos os isolados obtidos foram estocados em meio BHI caldo acrescido de 20% de glicerol à -20°C.

3.2 Macroscopia

O conteúdo intrauterino foi classificado e agrupado quanto ao seu aspecto macroscópico no LaBacVet. A classificação foi realizada com a observação do conteúdo intrauterino presente na seringa estéril e no momento da incisão do útero. As amostras foram classificadas como piometra quando o conteúdo intrauterino era exsudato purulento, de coloração esbranquiçada a amarelada, com consistência líquida a densa. Por outro lado, quando o conteúdo apresentou coloração avermelhada a amarronzada, indicando a presença de sangue, o mesmo foi classificado como hemometra; ao apresentar coloração transparente a esbranquiçada, com aspecto seroso, foram consideradas como hidrometra, ou mucometra quando a consistência era mais firme. Independente da classificação macroscópica, todas as amostras foram analisadas igualmente no presente trabalho.

3.3 Microscopia

Os úteros e ovários foram encaminhados ao Setor de Patologia Veterinária da UFRGS, onde foi executado o preparo de lâminas histológicas com a coloração eosina e hematoxilina. Posteriormente, foi feita a análise das lâminas histológicas em microscopia ótica para identificação das lesões histológicas. Baseado nas alterações observadas os animais foram divididos em grupos denominados de: i) casos leves; ii) casos moderados; e iii) casos acentuados.

3.4 Imuno-histoquímica

Foi realizado o ensaio imuno-histoquímico (IHQ) de duas amostras uterinas cujo isolamento bacteriano foi identificado como *E. coli* (LBV029/18 e LBV037/18). Secções de útero foram submetidas à técnica de IHQ pelo método de polímero universal marcado com peroxidase (MACH 4 Universal HRP-Polymer - Biocare Medical), para o agente *E. coli*, sendo utilizado um anti-corpo anti-*E. coli* policlonal primário (Virosat), conforme descrito por De Lorenzo *et al.* (2018). Controles positivos foram inseridos simultaneamente com as lâminas testadas e consistiram de casos confirmados previamente.

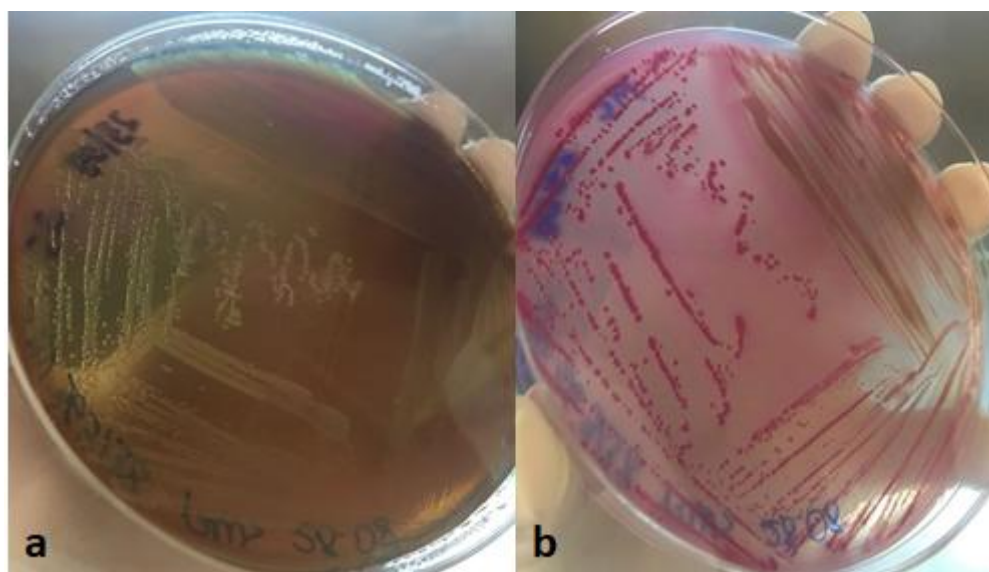
4 RESULTADOS

Os resultados referentes a este estudo foram divididos em: i) microbiológicos; ii) resultados macroscópicos; iii) resultados microscópicos.

4.1 Achados Microbiológicos

Com o resultado positivo para o crescimento bacteriano nos meios de cultivos de Ágar Sangue 5% ovino e Ágar MacConkey, foi executada a identificação do gênero e/ou espécie bacteriana por métodos bioquímicos específicos conforme Quinn *et al.* (1994). A identificação bacteriana foi limitada a identificação em nível de gênero, exceto quando da ocorrência de *E. coli* onde foi possível a confirmação destas espécies. Nas amostras de piometra de origem canina, observou-se uma ocorrência maior de isolamento da espécie *E. coli* (Figura 1), seguido pelo gênero *Streptococcus* spp.

Figura 1 – Cultivo bacteriano com o isolamento de *Escherichia coli*

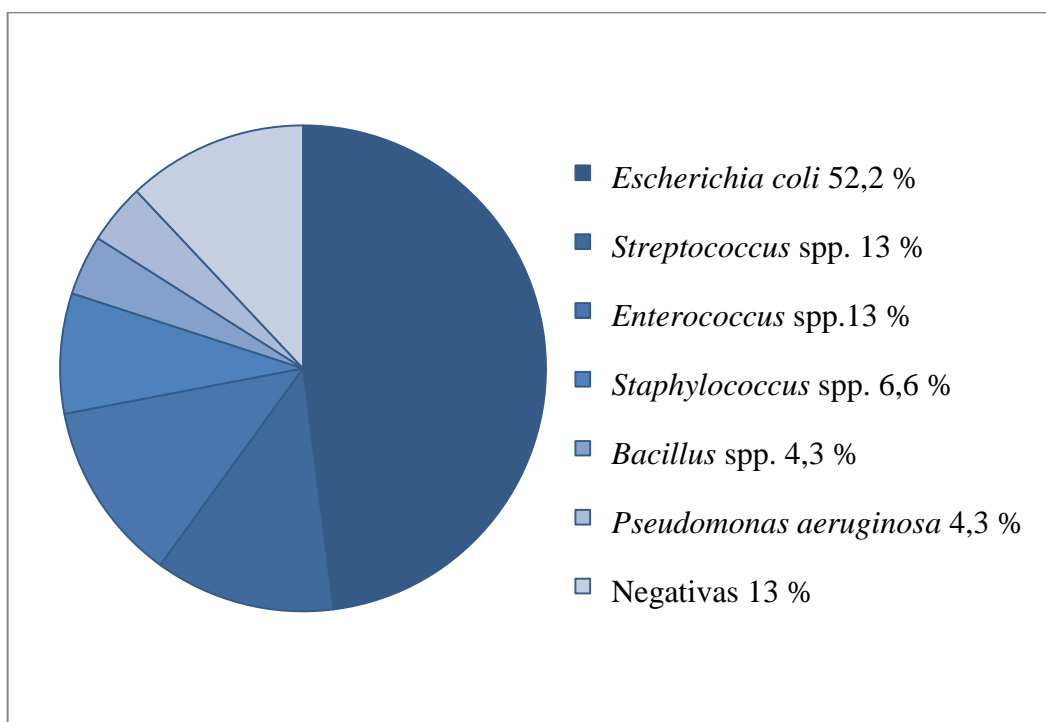


Amostra LBV163/18 em (a) Ágar Sangue ovino 5% e (b) Ágar MacConkey. Cultivada a 37°C em aerobiose durante 24horas. Fonte: Próprio autor.

O gênero *Staphylococcus* spp. apresentou uma menor proporção de isolamento, juntamente com o gênero *Bacillus* spp., que foi isolado em apenas uma amostra. O mesmo padrão foi observado para as amostras dos felinos, nas quais a maior ocorrência foi da espécie *E. coli*, seguido por *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. A espécie bacteriana

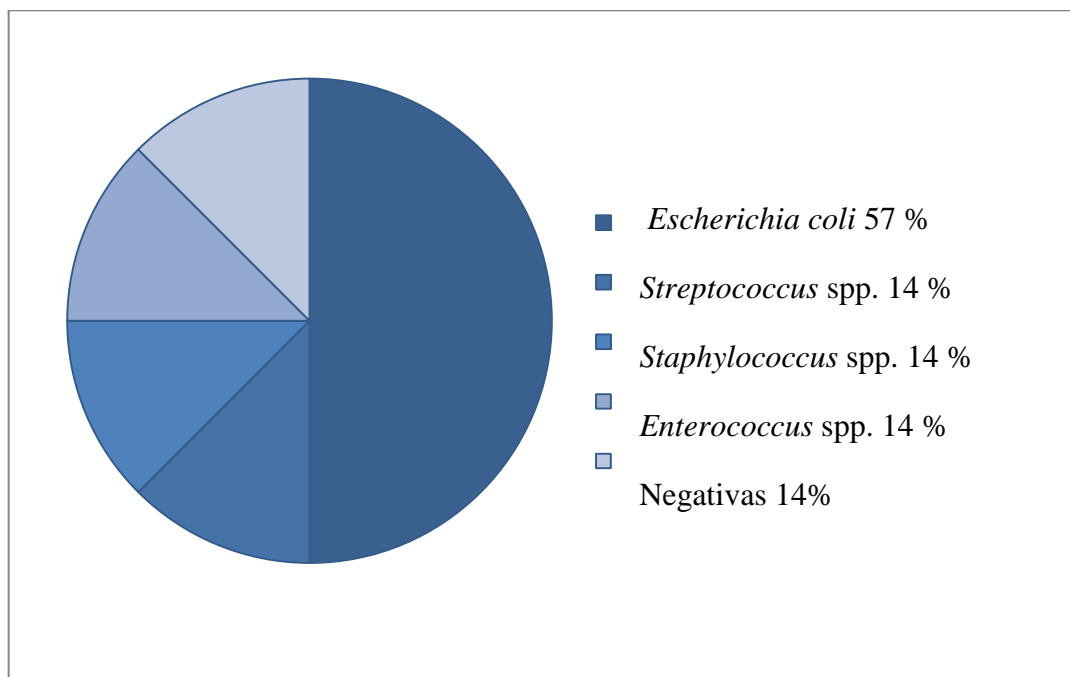
mais identificada, nos casos de piometra, foi *E. coli*, acometendo os caninos em 52,17% (12/23) dos casos, felinos em 57,14% (4/7) dos casos, somando uma ocorrência total de 53,33% (16/30). O gênero bacteriano *Streptococcus* spp. apresentou uma ocorrência total de 13,33% (4/30): em caninos foi de 13,04% (3/23) e em felinos de 14,28% (1/7). No gênero bacteriano *Enterococcus* spp. o mesmo comportamento foi observado, onde a sua observação total foi de 13,33% (4/30): em caninos foi de 13,04% (3/23) e em felinos de 14,28% (1/7). Em relação ao gênero *Staphylococcus* spp., observou-se um total de 10% (3/30): em caninos 8,69% (2/23); e em felinos de 14,28% (1/7). Os isolamentos de *Staphylococcus* spp. caracterizaram-se por serem mistos, em associação com outras bactérias, como *E. coli* e *Bacillus* sp. em caninos; e com *Streptococcus* sp. na amostra felina. Uma única amostra canina apresentou no isolamento o gênero *Bacillus* sp., e a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, ambas com uma ocorrência, cada uma de 3,33% (1/30). No total, 13,33% (4/30) das amostras foram negativas, sendo três amostras de canino e uma amostra de felino. Em relação às amostras provenientes do grupo controle negativo, os isolados foram negativos. Os resultados estão expostos nas Figuras 2 e 3.

Figura 2 – Gráfico ilustrando a identificação bacteriana dos conteúdos uterinos de caninos acometidos por piometra



Fonte: Próprio autor.

Figura 3 – Gráfico ilustrando a identificação bacteriana em conteúdos intrauterinos de felinos acometidos por piometra

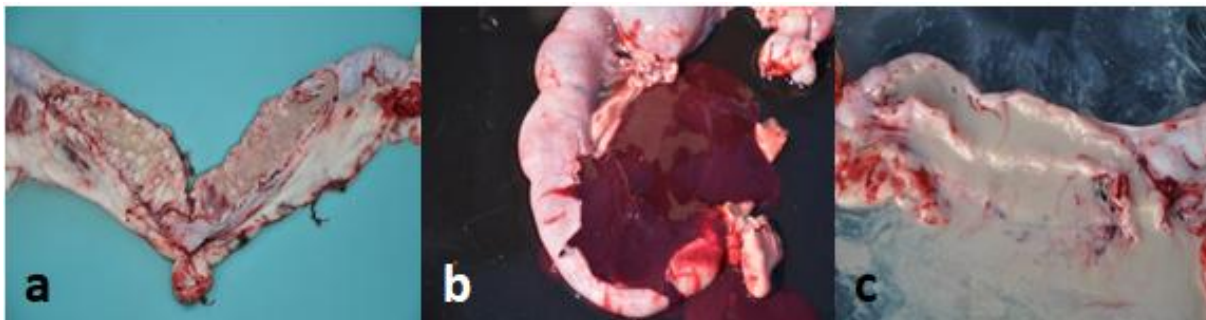


Fonte: Próprio autor.

4.2 Achados Macroscópicos

Na macroscopia, as amostras foram classificadas de acordo com o aspecto do conteúdo intrauterino observado no momento da excisão do útero. Foram consideradas como piometra quando o conteúdo tinha característica de exsudato purulento, de coloração esbranquiçada a amarelada, com consistência líquida a densa. Por outro lado, quando o conteúdo apresentou coloração avermelhada a amarronzada, o mesmo foi classificado como hemometra; ao apresentarem coloração transparente a esbranquiçada, com aspecto seroso, foram consideradas como hidrometra, ou mucometra quando a consistência era mais firme. A Figura 4 ilustra o aspecto macroscópico dos diferentes tipos de exsudato.

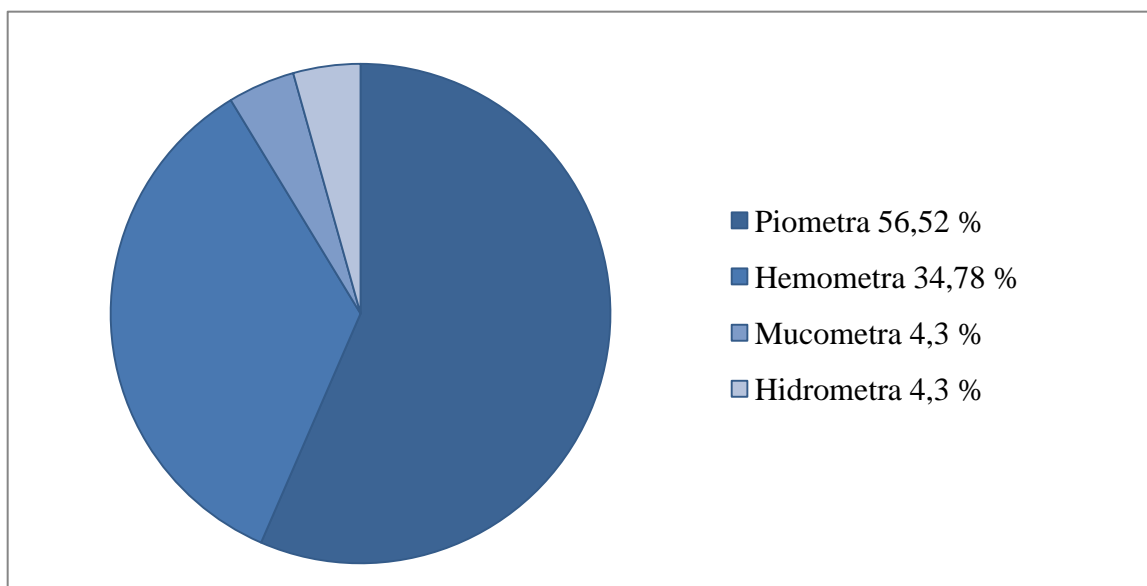
Figura 4 – Aspecto macroscópico dos úteros e do conteúdo intrauterino



Úteros abertos com conteúdo intrauterino.(a) Mucometra, (b) Hemometra, (c) Piometra. Fonte: Próprio autor.

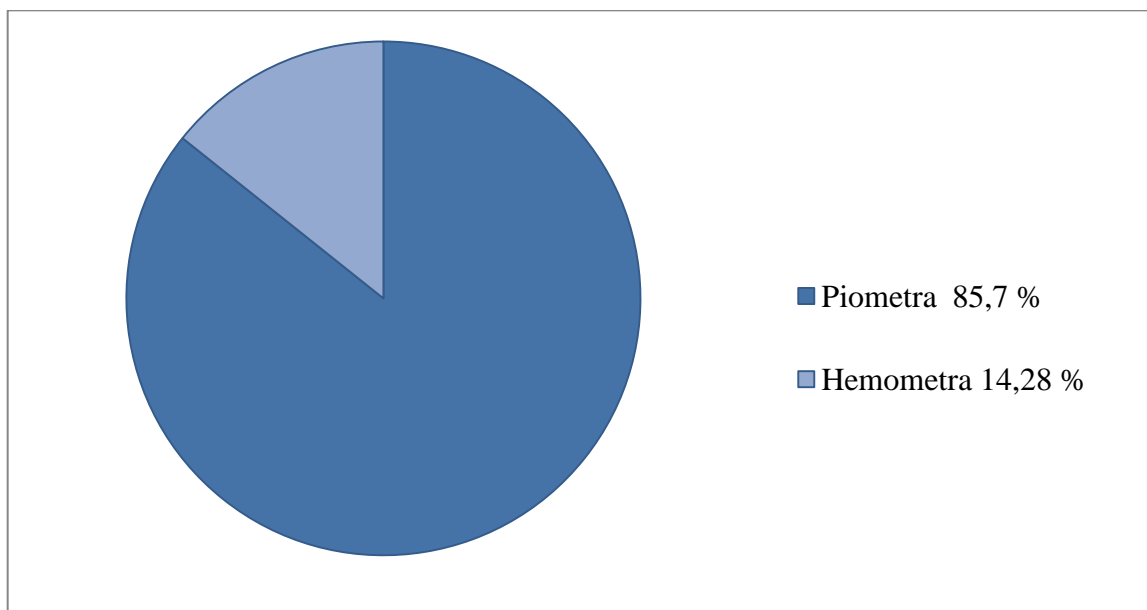
Dentre as amostras de caninos 56,52% (13/23) apresentaram-se como piometras, 34,78% (8/23) hemometras, 4,3% (1/23) como hidrometra e 4,3% (1/23) como mucometra. Já entre as amostras de felinos 85,7% (6/7) foram classificadas como piometras e 14,28% (1/7) como hidrometra. Os resultados referidos estão dispostos nas Figuras 5 e 6, para caninos e felinos, respectivamente.

Figura 5 – Gráfico com a classificação dos conteúdos intrauterinos dos caninos



Fonte: Próprio autor.

Figura 6 – Gráfico com a classificação dos conteúdos intrauterinos dos felinos



Fonte: Próprio autor.

Em relação à análise macroscópica dos ovários, na grande maioria (60%), não foi observada alterações na macroscopia, com exceção de oito amostras que apresentaram cistos foliculares (representados na Tabela 1), e da amostra LBV142/18 apresentou-se com um tumor ovariano.

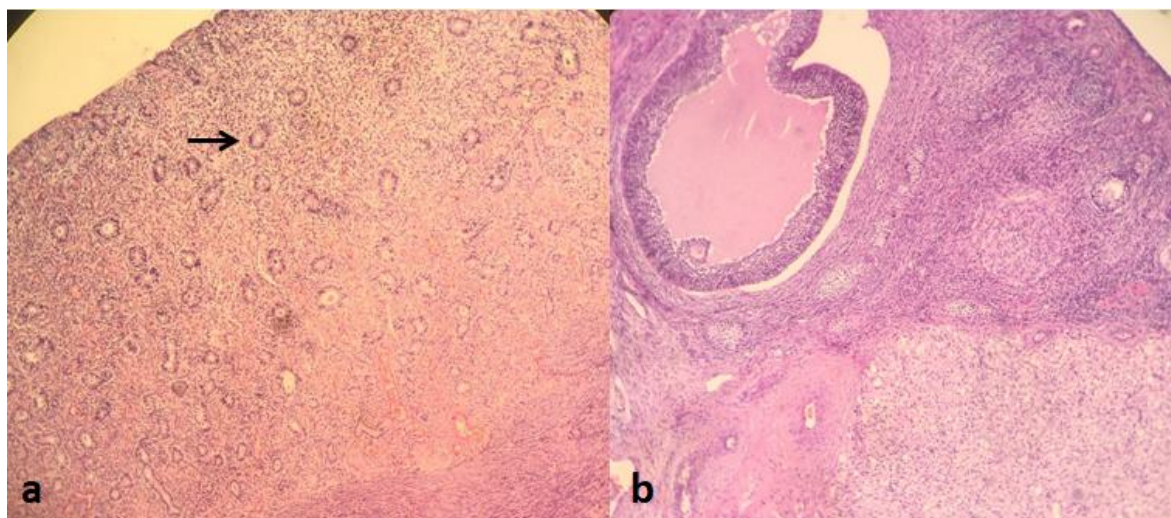
4.3 Achados Microscópicos

As amostras uterinas foram divididas em grupos de acordo com a severidade e os aspectos morfológicos observados. Foram estipulados três grupos e as lesões graduadas em leve, moderadas e acentuadas. Com isso, foi possível estabelecer diferentes estágios das lesões, no qual as alterações uterinas leves foram representadas basicamente por casos com discretas alterações, enquanto que os casos moderados e acentuados demonstraram graus intensos de lesões. Abaixo segue as descrições detalhadas dos grupos.

A histologia normal uterina é composta de três camadas: a mucosa e submucosa (endométrio), muscular (miométrio) e serosa (perimétrio). Em caninos e felinos, o epitélio endometrial é colunar simples. Glândulas tubulares estão presentes em todo o endométrio, e seu epitélio também é colunar simples, sendo compostos por células secretórias e não secretórias. O miométrio é composto de duas camadas musculares, que diferem na

disposição das fibras musculares lisas. Já o perimétrio é composto por tecido conjuntivo frouxo (PRIEDKALNS *et al.*, 2012). Nos animais do grupo controle essas foram as observações nas lâminas estudadas, sendo que a histologia uterina e ovariana não apresentaram alterações. A Figura 7 demonstra a histologia normal do grupo controle.

Figura 7 - Lâminas histológicas ilustrando estruturas uterinas e ovarianas do grupo controle



(a) Endométrio uterino com a seta indicando uma glândula endometrial de conformação normal e (b) ovário de canino fêmea de quatro anos de idade utilizada no grupo controle. Fonte: Próprio autor.

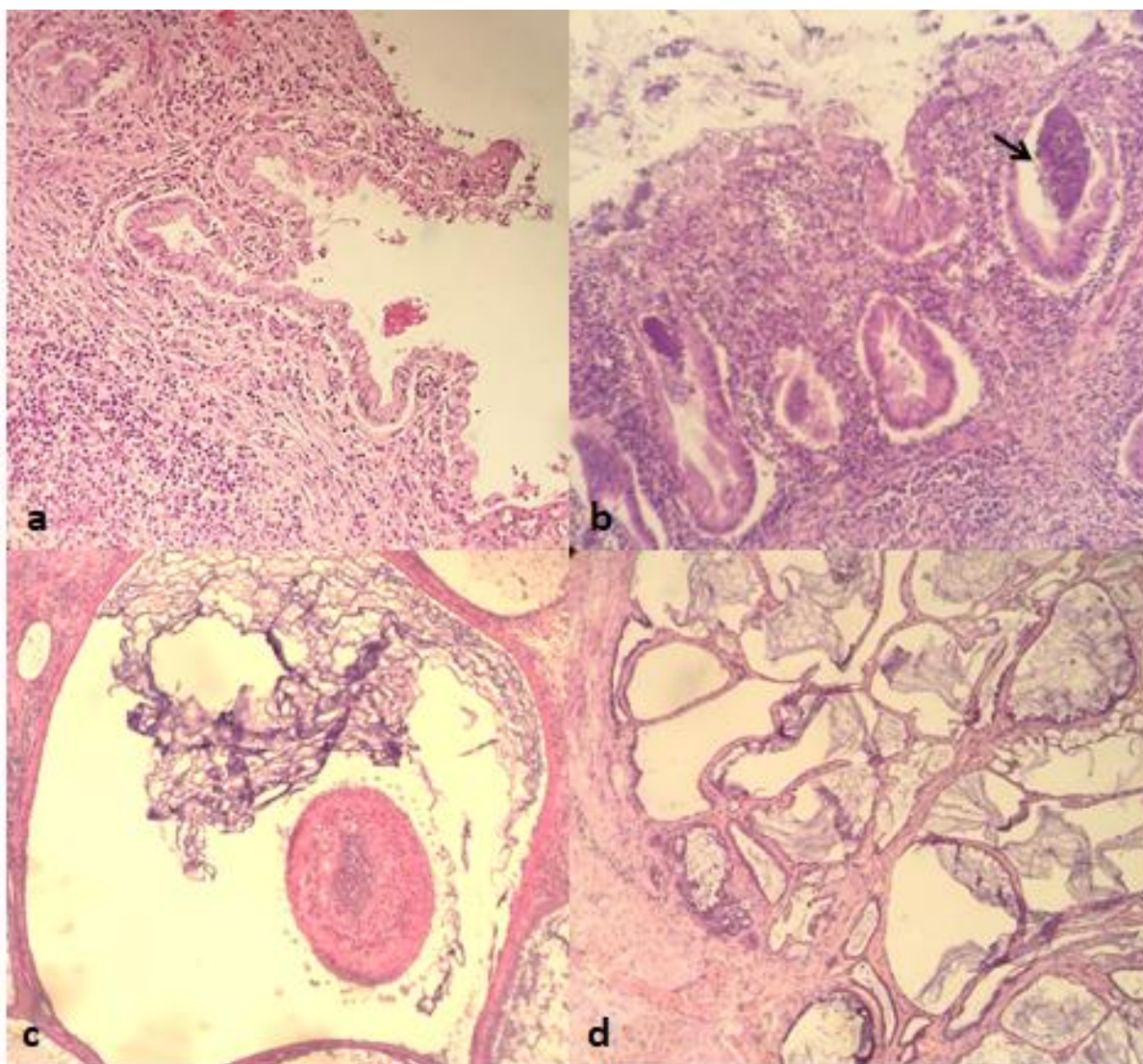
As lesões uterinas consideradas leves, representando 13,3% do total dos úteros estudados, apresentavam alterações restritas ao endométrio e eram caracterizadas principalmente por áreas focais de discreta hiperplasia de glândulas endometriais, com ocasional ectasia. Algumas glândulas ectásicas estavam preenchidas por material amorfo basofílico. Na lâmina própria e submucosa visualizou-se discreto infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos.

Nos casos classificados com lesões uterinas moderadas (30% dos casos), as alterações observadas incluíam graus mais acentuados de hiperplasia e ectasia endometrial, associado a moderado infiltrado inflamatório de neutrófilos íntegros e degenerados, linfócitos, plasmócitos e macrófagos, visualizados predominantemente no interstício das glândulas endometriais e no lúmen uterino. Ocasionalmente, havia também infiltrado inflamatório neutrofílico no interior de algumas glândulas ectásicas, além de secreção basofílica ou eosinofílica. Em algumas áreas o epitélio endometrial e epitélio glandular apresentava-se hiperplásico (contendo várias camadas), vacuolizado e com focos de necrose e invasão de neutrófilos. Por vezes, os vacúolos distendiam acentuadamente o

citoplasma das células e continham material basofílico granular. Notou-se também em alguns casos (18 amostras), infiltrado inflamatório focal no miométrio.

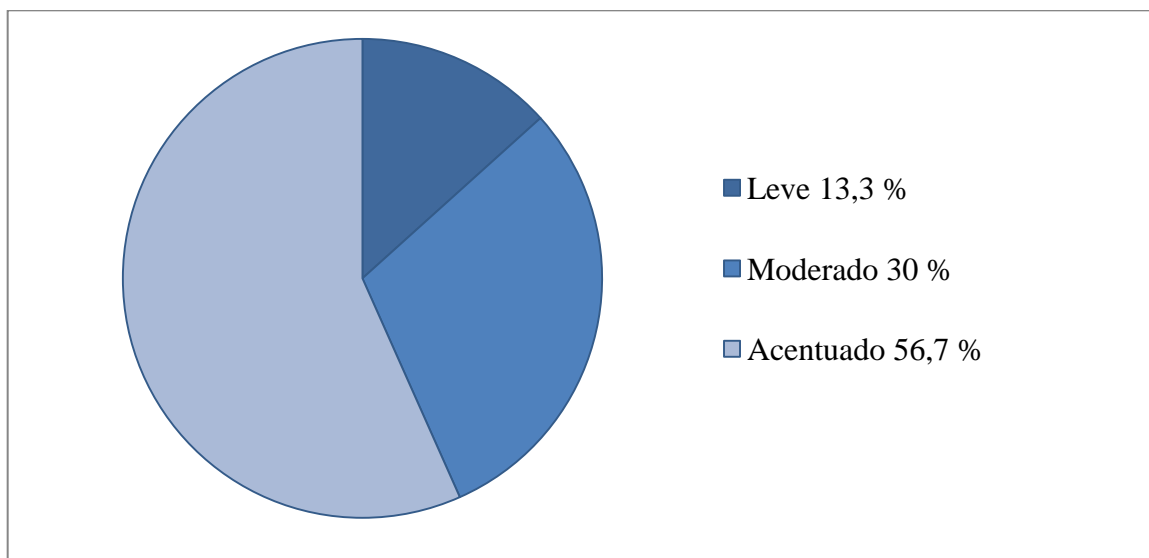
Enquadradas no grupo de grau acentuado, ficaram 17 amostras (56,7%). As alterações morfológicas observadas nesse grupo foram semelhantes às descritas no grupo anterior, entretanto, com maior grau de intensidade. Adicionalmente, havia áreas de marcada necrose do endométrio, associado a acentuado infiltrado inflamatório misto, que também ocluía o lúmen uterino. Em alguns casos a necrose e a inflamação eram intensas e ocasionava a perda da arquitetura endometrial. Na Figura 8 são ilustradas algumas das alterações anteriormente descritas. Por outro lado, as classificações da severidade das lesões estão dispostas na Figura 9.

Figura 8 - Lâminas histológicas ilustrando estruturas uterinas de animais de companhia com piometra



Úteros de caninos fêmeas (a) LBV077/18, ilustrando a presença do infiltrado inflamatório, (b) LBV037/18 a seta indica uma miríade bacteriana, ilustrando a presença da necrose do epitélio uterino, (c) LBV029/18, ilustra a presença de material basofílico amorfo no lúmen glandular e (d) LBV115/18 ilustrando a hiperplasia endometrial cística. Fonte: Próprio autor.

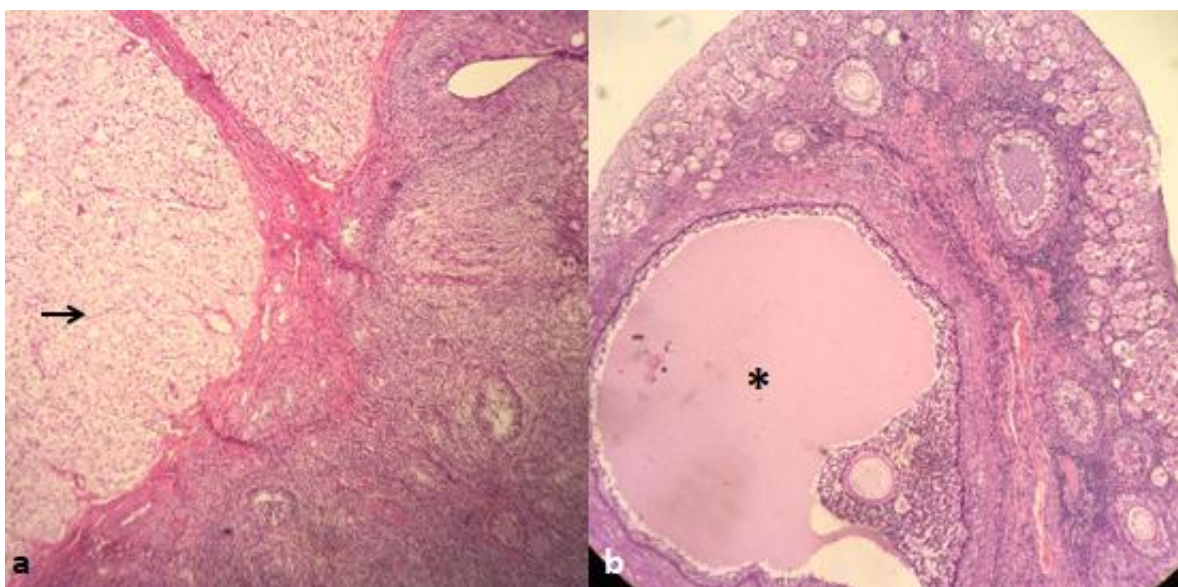
Figura 9 – Gráfico com os resultados da classificação das amostras de acordo com a severidade dos achados histopatológicos



Fonte: Próprio autor.

Os 20 ovários que foram encaminhados para a histopatologia, apresentaram folículos ovulatórios em diferentes fases, corpos lúteos, representados na Figura 10, e ocasionalmente cistos foliculares. Tais achados estão detalhados na Tabela 1.

Figura 10- Lâminas histológicas ilustrando estruturas ovarianas de animais de companhia



(a) Ovário de canino fêmea LBV054/18 com a seta indicando a estrutura de um corpo lúteo e (b) ovário de felino fêmea LBV126/18 com o asterisco indicando a estrutura de um corpo lúteo. Fonte: Próprio autor.

Tabela 1 – Achados histológicos ovarianos de animais de companhia com piometra

Amostra	Folículos Ovulatórios	Corpo Lúteo	Cisto Folicular
LBV045/18	X	X	X
LBV053/18	X	X	
LBV054/18	X	X	X
LBV070/18	X	X	X
LBV071/18	X	X	X
LBV072/18	X	X	X
LBV077/18	X	X	X
LBV084/18	X	X	
LBV112/18	X	X	X
LBV114/18	X	X	
LBV121/18	X	X	
LBV126/18	X		
LBV133/18	X	X	
LBV142/18	X	X	
LBV163/18	X	X	
LBV179/18	X	X	X
LBV183/18	X	X	
LBV188/18	X	X	
LBV189/18	X	X	
LBV194/18	X	X	X

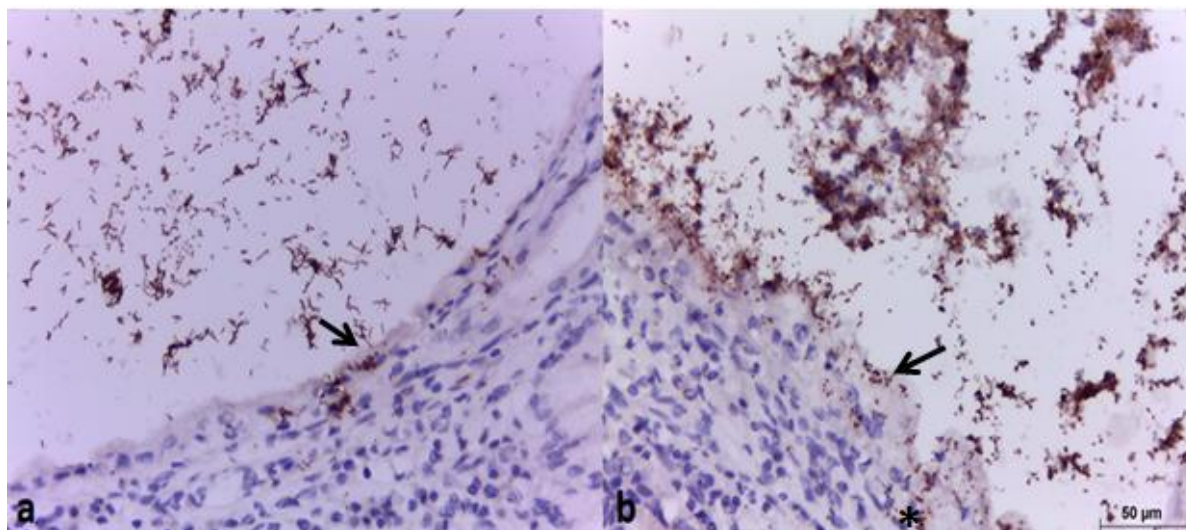
Fonte: Próprio autor.

4.4 Ensaio Imuno-Histoquímico

Procedeu-se o ensaio imuno-histoquímico, de duas amostras uterinas que apresentaram no isolamento bacteriano a espécie *E. coli* (LBV029/18 e LBV037/18), o qual é ilustrado na Figura 11. Nas duas análises, pode-se observar a presença de células bacterianas com formato cocoide a bacilar, marcadas no ensaio imuno-histoquímico com anticorpos anti-*E. coli*. As células bacterianas apresentavam-se ao longo das células

epiteliais do endométrio, no interior do tecido, na região endometrial, e no lúmen uterino e glandular.

Figura 11 - Lâminas histológicas uterinas marcadas com o ensaio imuno-histoquímico



Úteros de caninos fêmeas (a) LBV029/18 com a seta indicando a invasão no epitélio do endométrio e (b) LBV037/18 com a seta indicando a adesão bacteriana no epitélio do endométrio e o asterisco indicando as bactérias presentes o interior do endométrio. Marcação com anticorpos anti-*E.coli*. Aumento de 400X. Fonte: Próprio autor.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho objetivamos compreender a patogênese da piometra, associando a identificação bacteriana presente no conteúdo intrauterino, a lesão observada na microscopia e o aspecto do conteúdo uterino na macroscopia. Após ter sido realizado o isolamento bacteriano e análise microscópica e macroscópica os dados foram analisados e comparados.

Dos quatro isolados microbiológicos negativos (LBV038/18, LBV041/18, LBV053/115 e LBV115/18), observamos que eles foram macroscopicamente classificados como hidrometra, piometra, hemometra e mucometra, respectivamente. Na análise microscópica, pela histopatologia, os úteros LBV041/18 e o LBV038/18 foram classificados com alterações leves, condizentes com o isolamento negativo. Contudo, os úteros LBV053/18 e LBV115/18 apresentaram lesões acentuada e moderada, respectivamente. Tal fato pode ser explicado por um provável uso de antibióticos previamente a realização do procedimento da ovariossalpingo-histerectomia. Também pode ser explicado por tratar-se de uma lesão inicial ou como uma lesão de maior cronicidade, diminuindo então o número de células bacterinas viáveis na amostra.

A maioria das amostras de piometra classificadas com lesões acentuadas foi associada ao isolamento da espécie *E. coli* (68,75% dos isolados de *E. coli* foram classificados como acentuados). Esse quadro corrobora com resultados anteriores que demonstraram que conteúdo purulento que foram identificadas no isolamento bacteriano como *E. coli* apresentam o epitélio endometrial e glândulas com severas alterações, infiltrado inflamatório na mucosa e no interior das glândulas (HENRIQUES *et al.*, 2016). Além disso, 62,5% dos conteúdos intrauterinos foram classificados como piometra, e 37,5% como hemometra.

Os patótipos de *E. coli* extraintestinais são os responsáveis por causar lesões em diversos locais, incluindo o útero (GYLES *et al.*, 2010), e as *E. coli* causadoras de piometra são classificadas como EmPEC (dados não publicados). No presente trabalho a ocorrência de *E. coli* observada foi de 53,3%, sendo a bactéria mais frequente em isolados de caninos e felinos, podendo alcançar uma ocorrência de 90% em caninos (GYLES *et al.*, 2010; FRANSSON *et al.*, 1997, HAGMAN, 2018). Em gatas, a ocorrência de piometra ocasionadas por *E. coli* pode chegar a 71% (HAGMAN, 2018).

Os fatores de virulência da espécie *E. coli* podem ser classificados como adesinas, toxinas e componentes celulares. As toxinas estão frequentemente associadas à morte celular ou à perda da função celular, o que aumenta a capacidade de colonização e estabelecimento da *E. coli* no tecido. *E. coli* possui um grande número de fatores de virulência e podem ter alta variabilidade entre as cepas. Esses fatores incluem a capacidade de colonização, invasão, aquisição de ferro, resistência à fagocitose e ao sistema complemento e toxinas (GYLES *et al.*, 2010).

Esse conjunto de fatores de virulência descritos na espécie *E. coli* pode explicar a gravidade das lesões observadas na histologia, demonstrando que os quadros com maior grau de alterações uterinas são associados à espécie. Por possuir diversos genes de virulência responsáveis pela síntese de toxinas, como a alfa-hemolisina, fator de necrose celular 1 (Cnf-1) e ciclomodulinas, pode-se compreender a severidade das lesões encontradas, como presença de necrose epitelial e celular, alto grau de infiltrado inflamatório e presença de miríades bacterianas. A presença de adesinas é essencial para que a bactéria possa aderir-se nas células ou na matriz extracelular, podendo colonizar os tecidos e infiltrar as células. No ensaio imuno-histoquímico pode ser visualizada a presença de adesão bacterina ao longo do epitélio endometrial, a qual deve ser devida ao aparato de proteínas com função de adesinas.

Já foi demonstrado que fatores como as adesinas do tipo fímbria P, fímbria S e fímbria tipo 1, toxinas como o Cnf-1 e a alfa-hemolisina são encontrados com alta frequência em isolados de *E. coli* provenientes de piometra, o que aponta para a suas importâncias na virulência e patogênese da enfermidade, sendo que alguns deles são também frequentemente associados em *E. coli* uropatogênicas (UPEC) (CHEN *et al.*, 2003). Dessa forma, o conjunto de adesinas conhecidas da espécie *E. coli*, entre elas as fímbria S, fímbria P e a fímbria tipo 1, pode explicar a presença de miríades bacterianas observadas na microscopia, além da aderência das células bacterianas nas células epiteliais, observadas na microscopia. Contudo, estudos demonstram que, mesmo com a deleção nos genes responsáveis pela fímbria do tipo 1, a colonização celular ainda ocorre, mostrando que outras adesinas podem causar o mesmo efeito (HENRIQUES *et al.*, 2016). Neste sentido, a análise genômica de *E. coli* EmPEC ilustra a presença de mais de cinco tipos de adesinas, explicando assim a alta afinidade e capacidade de aderência da bactéria no epitélio endometrial (dados não publicados). Outra adesina que pode ser encontrada em

isolados provenientes de infecções uterinas é a Usp (RIBEIRO *et al.*, 2016), que tem a capacidade de induzir a apoptose celular (NIPIC *et al.*, 2013).

As toxinas conhecidas dentro da espécie *E. coli* possuem potencial capacidade de lesionar os tecidos, levando à necrose e a presença de infiltrado inflamatório, que pode ser observado na microscopia uterina. A toxina Cnf-1 já foi encontrado em isolado de *E. coli* provenientes de piometra (SIQUEIRA *et al.*, 2009). Dessa forma, a presença da toxina Cnf-1 poderia explicar a presença da necrose observada na microscopia, que proporciona o grau acentuado das lesões visualizadas. *E. coli* isoladas de piometras e infecções do trato urinário frequentemente expressam genes de virulência responsáveis por citotoxinas (SIQUEIRA *et al.*, 2009). Além disso, a toxina ciclodulina também ocasiona a morte celular, ou pode interferir no funcionamento da célula do hospedeiro (MOXLEY, 2016), também podendo ser responsável pelas lesões compatíveis com necrose apresentadas. No ensaio imuno-histoquímico pode ser observada a presença de células bacterianas no interior do tecido, mostrando sua capacidade de invadir o endométrio do hospedeiro. Além disso, na microscopia pode ser visualizada a presença acentuada de infiltrado inflamatório, demonstrando que é importante para a patogenicidade bacterina de *E. coli* em piometras.

Dentre os isolados de *E. coli* do presente trabalho, todos apresentaram diferentes graus de hemólise no isolamento em Ágar Sangue Ovino 5%, sendo este efeito relacionado à expressão de hemolisina pela bactéria. Além disso, estudos demonstram que a presença do gene para produção da alfa-hemolisina já foi encontrada em isolados de piometra (SIQUEIRA *et al.*, 2009).

Evidenciou-se que possuir o gene para alfa-hemolisina é um importante fator para a patogenicidade da *E. coli* em piometras, pois o epitélio endometrial é sensível à citotoxicidade da alfa-hemolisina, levando à sua destruição. A alfa-hemolisina também tem a capacidade de induzir dano tecidual, comprometendo, dessa forma, a resposta imune uterina, e facilitando a difusão das bactérias pelo tecido. As células do estroma do útero são ainda mais sensíveis ao efeito citotóxico, o que pode explicar a presença da metrite (HENRIQUES *et al.*, 2016) demonstrada pelo infiltrado inflamatório na camada muscular presente em algumas amostras uterinas analisadas neste trabalho. Além disso, a presença da alfa-hemolisina pode diminuir a síntese de citocinas pelo estroma uterino, que leva à facilitação da colonização bacteriana nos estágios iniciais da piometra (HENRIQUES *et al.*, 2016). Foi demonstrado que *E. coli* EmPEC podem possuir dois genes que codificam hemolisinas, sendo um a alfa-hemolisina, codificada pelo gene *HlyA* e outro para a

hemolisina E, codificada pelo gene *HlyE* (dados não publicados), que possui atividade como hemolisina e com efeito citotóxico para leucócitos (WYBORN *et al.*, 2004). Componentes das células bacterianas podem colaborar para a patogênese bacteriana, como o LPS que atua como endotoxinas provocando uma reação inflamatória (KARLSSON *et al.*, 2015).

Nas amostras de ovários que foram encaminhadas para histopatologia, verificou-se que todos os ovários, com exceção da amostra LBV126/18, apresentavam corpos lúteos, que têm por função a secreção de progesterona, um hormônio esteroide (STOUFFER *et al.*, 2013). Estudos já demonstraram que a progesterona inibe a resposta imune contra a presença de *E. coli*, o que se torna um agravante para a colonização e crescimento dessa espécie no ambiente uterino (MAEDA *et al.*, 2012). Esse fator ajuda a elucidar o sucesso da *E. coli*, em infecções uterinas, e a sua alta ocorrência.

Para ser patogênica, a espécie *E. coli* deve possuir os genes codificadores dos fatores de virulência, que podem ser adquiridos por transdução, conjugação ou transformação de outras *E. coli* patogênicas. Dessa forma, uma cepa não patogênica pode adquirir os genes de virulência necessários para tornar-se potencialmente patogênica (MOXLEY, 2016).

A ocorrência total de isolados identificados como *Streptococcus* spp. foi de 13,3%. Os isolados foram classificados na microscopia como lesões moderadas e acentuadas. Na classificação macroscópica, 75% foram agrupados como piometra, e 25% como hemometra.

A patogenicidade do gênero *Streptococcus* spp. ocorre devido ao envolvimento de diversos fatores de virulência que colaboram para a instalação da doença. A capacidade de iniciar a infecção é ocasionada pela atividade de adesinas, que são responsáveis por aderir as bactérias em superfícies do hospedeiro. Além disso, o gênero tem a capacidade de não permitir a opsonização (processo necessário para iniciar a fagocitose), colonizar e invadir células do hospedeiro, produzir toxinas e enzimas, além de estimular o sistema imune, gerando uma reação inflamatória que resulta em aumento da permeabilidade vascular ocasionando a formação de exsudato purulento (MELVILLE *et al.*, 2016).

As adesinas do gênero *Streptococcus* spp. possuem a capacidade de aderir as bactérias na matriz extracelular do hospedeiro infectado, em substâncias como fibrinogênio e colágeno. A adesina proteína M permite a ligação da bactéria no fibrinogênio, e possui atividade antifagocitária. Existem diversas adesinas relatadas dentro do gênero com a função

de fixação da célula bacteriana (STEWART, 2016). A presença de adesinas é essencial para iniciar a colonização bacteriana e levar ao processo inflamatório.

Componentes celulares bacterianos do gênero *Streptococcus* spp. podem atuar como fatores de virulência. Um dos componentes, a cápsula de ácido hialurônico, ajuda na resistência bacteriana no organismo do hospedeiro, tornando-se importante para ocasionar a infecção (MELVILLE *et al.*, 2016). Outro componente é a parede celular, que juntamente com seus constituintes podem provocar uma resposta inflamatória (STEWART, 2016), a qual pode explicar a presença do infiltrado inflamatório observado na lesão microscópica.

A presença de toxinas, que estão descritas no gênero, pode explicar as lesões observadas, principalmente os casos mais acentuados, como necrose celular e infiltrado inflamatório. A toxina pirogênica estreptocócica, por exemplo, têm a capacidade de liberar uma alta quantidade de citocinas pró-inflamatórias (STEWART, 2016). Já a estreptolisina S ocasiona uma hemólise total, sendo associadas às espécies mais patogênicas (STEWART, 2016).

Esse vasto conjunto de fatores de virulência descritos no gênero *Streptococcus* spp. ajuda a elucidar a gravidade da lesão que foi observada microscopicamente, principalmente nas classificadas como acentuadas (LBV034/18 e LBV112/18). Apesar da ocorrência dos isolados de *Streptococcus* spp. do conteúdo intrauterino neste estudo ter sido de 13,3%, existem poucos relatos na literatura de casos de piometra ocasionados pelo gênero, diferentemente do que ocorre na espécie *E. coli*. Poucos estudos estabelecem a relação entre a infecção uterina e o gênero, mas aqueles que analisam a ocorrência de *Streptococcus canis* em caninos demonstram que a espécie causando piometra ou metrite, dentre outras doenças, ocorre em 7,46% dos casos (KRUGER *et al.*, 2010). Outros relatos mostram que a ocorrência de piometras ocasionadas por *Streptococcus* spp. em cadelas pode variar entre 4-23% e, em gatas, pode ser de até 19% (HAGMAN, 2018), os quais são valores mais próximos aos encontrados no presente estudo.

O gênero *Enterococcus* spp. foi isolado em 13,3% das amostras de piometra, porém não é frequentemente relatado na literatura, não sendo vinculado à piometra. Na microscopia, um caso foi classificado como leve (25%), um como acentuado (50%) e os demais como moderados (50%). Já na macroscopia, apenas um caso (25%) foi classificado como hemometra, e 75% como piometras. O gênero *Enterococcus* spp. é encontrado no trato gastrointestinal dos mamíferos e aves, de forma comensal. São patógenos

oportunistas, e provocam infecções em sítios que já apresentam lesões. (STEWART, 2016).

Alguns dos fatores de virulência descritos no gênero ajudam a compreender as lesões microscópicas observadas nos úteros. A adesina, substância de agregação, promove a fixação entre as células bacterianas e as células do hospedeiro, fornecendo a capacidade de formar agregados bacterianos. A proteína de superfície de *Enterococcus* é importante para produção de biofilme e para a colonização do trato urinário. A presença de cápsula polissacarídica descrita em algumas espécies impede a fagocitose, promovendo a permanência bacteriana no sítio de infecção. Já os componentes da parede celular, o peptidoglicano e ácidos lipoteicoicos, são pró-inflamatórios. Existem toxinas descritas, como a citolisina, que promove a destruição celular, e também tem função hemolítica (em algumas espécies de mamíferos apenas) (STEWART, 2016).

Tais fatores de virulência mencionados demonstram que o gênero *Enterococcus* spp. pode ocasionar lesões microscópicas em casos de piometra. Contudo, os relatos na literatura sobre piometra ocasionadas por *Enterococcus* spp. são bastante escassos.

Nos isolados LBV024/18, LBV034/18 e LBV072/18 foi identificado o gênero *Staphylococcus* spp. Nestas amostras, na microscopia, foram observadas lesões de menor intensidade, exceto na amostra LBV034/18, de origem felina, foi classificada como grau acentuado. Além disso, todos os isolados de *Staphylococcus* spp. foram associados a crescimento bacteriano mistos, tendo sido identificados concomitantemente o gênero *Bacillus* sp. no isolado LBV024/18, o gênero *Streptococcus* sp. no isolado LBV034/18 e a espécie *Escherichia coli* no isolado LBV072/18. Os isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes dos LBV034/18 e LBV072/18 foram caracterizadas como *Staphylococcus* coagulase positiva, um importante fator de virulência, e que é um forte indicador da patogenicidade da cepa. A coagulase converte o fibrinogênio em fibrina, o que auxilia na proteção das células bacterianas contra as células fagocitárias (QUINN *et al.*, 2005). Na macroscopia, um dos conteúdos intrauterinos foi classificado como hidrometra e dois como piometras.

Alguns dos fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade do gênero *Staphylococcus* spp., são a presença de coagulase, catalase, lipases, hialuronidase, fosfolipase, proteína A, alfa-toxina e toxina da síndrome do choque tóxico (QUINN *et al.*, 2005). Mesmo com diversos e importantes fatores de virulência descritos, o gênero não apresentou lesões significativas na microscopia deste estudo.

O gênero é pouco relatado na literatura em infecções uterinas, sendo pouco associado à piometra, o que vem ao encontro com os nossos resultados, pois observamos uma baixa ocorrência (10%), e sua baixa patogenicidade, por não terem sido frequentemente observadas lesões de graus acentuados. A literatura demonstra que o gênero *Staphylococcus* spp. ocorre em 2-15% dos casos em cadelas e em 8% dos casos em gatas (HAGMAN, 2018). Além disso, no nosso presente estudo, o gênero também foi associado a outros gêneros bacterianos no isolamento microbiológico do conteúdo intrauterino, como *E. coli* e *Bacillus* spp., o que vai ao encontro com estudos anteriores (DHALIWAL *et al.*, 1998).

Finalmente, no presente trabalho também foram isolados o gênero *Bacillus* sp. e a espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Ambos foram pouco significativos, ocorrendo em apenas um caso, com uma ocorrência de 3,33% cada. O gênero *Bacillus* sp. foi isolado em conjunto com o gênero *Staphylococcus* sp., em um isolamento misto. Ambos foram em caninos e tiveram as lesões na microscopia classificadas como leve e acentuada, respectivamente. Já na macroscopia, o isolado de *Bacillus* sp. foi obtido de um conteúdo intrauterino classificado como hidrometra, e a *P. aeruginosa* de um conteúdo intrauterino classificado como piometra. O gênero *Pseudomonas* spp. é relatado na literatura como tendo uma ocorrência de 1-8% em isolados de piometra em caninos fêmeas (HAGMAN, 2018), indo ao encontro com o nosso estudo. Já o gênero *Bacillus* spp. até o presente momento, não foi associado com quadros de piometras.

6 CONCLUSÃO

Com a realização do presente trabalho foi possível compreender as lesões uterinas resultantes da colonização e invasão bacteriana em casos de piometra. Dessa forma, possibilitou-se a compreensão da severidade e das diferenças entre os achados microscópicos dos variados isolados bacterianos encontrados nos quadros de piometra.

Interessantemente, foi possível relacionar os isolados identificados como *E. coli* com as lesões microscópicas mais severas, que também foi o isolado de maior ocorrência nos casos estudados. No ensaio imuno-histoquímico também foi possível perceber a capacidade da *E. coli* de adesão ao longo do epitélio endometrial e invasão do endométrio.

Por fim, relacionando as lesões causadas e as bactérias envolvidas, importantes informações quanto aos mecanismos de estabelecimento e desenvolvimento das lesões no epitélio endometrial, principalmente por *E. coli* foram apresentadas, as quais ajudam a elucidar a patogênese do quadro da piometra.

REFERENCIAS

- BENITES, N. R., MELVILLE, P. A., RIBEIRO, M. G. Estafilococcias. . *In*: MEGID, J., RIBEIRO, M. G., PAES, A. C. **Doenças Infeciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. cap. 29, p. 300-314.
- CHEN, Y. M. M., WRIGHT, P. J., LEE, C. S., BROWNING, G. F. Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 57-69, fev. 2003.
- DE LORENZO, C., ANDRADE C. P., MACHADO, V. S. L., BIANCHI, M. V., ROLIM, V. M, CRUZ, R. A. S. DRIEMEIER, D. Piglet colibacillosis diagnosis based on multiplex polymerase chain reaction and immunohistochemistry of paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Science**. Seoul, v. 19, n. 1, p. 27-33. jan. 2018.
- DHALIWAL, G. K., WRAY, C., NOAKES, D. E. Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra). **The Veterinary Record**, Londres, v. 143, p. 659-661, dez. 1998.
- EMÖDY, L., KERÉNYI, M., NAGY, G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 22, p. S29-S33, 2003.
- FELDMAN, E. C. O complexo hiperplasia endometrial cística/piometra e infertilidade em cadelas. *In*: ETTINGER, S. J. FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do Cão e do Gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 2 v. cap. 162, p. 1632 – 1649.
- FRANSSON, B., LAGERSTEDT, A. S., HELLMEN, E., JONSSON, P. Bacteriological Findings, Blood Chemistry Profile and Plasma Endotoxin Levels in Bitches with Pyometra or other Uterine Diseases. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlim, v. A 44, p. 417-426, 1997.
- GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, C. L. *Escherichia coli*. *In*: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G. THOEN, C. O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. cap. 15, p. 268-308.
- HAGMAN, R., KÜHN, I. *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 84, p. 143-153, ago. 2002.
- HAGMAN, R. Pyometra in Small Animals. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 48, p. 639-661, 2018.
- HENRIQUES, S.; SILVA, E.; SILVA M. F.; CARVALHO, S.; DINIZ, P.; LOPES-DA-COSTA, L.; MATEUS, L. Immunomodulation in the canine endometrium by uteropathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Research**, Paris, v. 47, n. 114, p. 1-17, 2016.

KARLSSON, I., HAGMAN, R., GUO, Y., HUMBLLOT, P., WANG, L., WERNERSSON, S. Pathogenic *Escherichia coli* and lipopolysaccharide enhance the expression of IL-8, CXCL5, and CXCL10 in canine endometrial stromal cells. **Theriogenology**, Los Altos, p. 1-9, fev. 2015.

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

KRUGER, E. F., BYRNE, B. A., PESAVENTO, P., HURLEY, K. F., LINDSAY, L. L., SYKES, J. E. Relationship between clinical manifestations and pulsed-field gel profiles of *Streptococcus canis* isolates from dogs and cats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 146, p. 167-171, abr 2010.

LYLE, S. K. Piometra e hiperplasia endometrial cística. In: TILLEY, L. P.; JUNIOR, F. W. K. S. **Consulta Veterinária em 5 minutos**. 5. ed. Barueri: Manole LTDA, 2015, p. 1042 – 1043.

MAEDA, Y., OHTSUKA, H., TOMIOKA, M., TANABE, T., NAMBO, Y., UEMATSU, H., OIKAWA, M. Effect of Progesterone on the in vitro Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated by *Escherichia coli* in Mares. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v. 74, n. 5, p. 629-632, 2012.

MELVILLE, P. A., BENITES, N. R., RIBEIRO, M. G. Estreptococcoses. In: MEGID, J., RIBEIRO, M. G., PAES, A. C. **Doenças Infeciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. cap. 30, p. 315-326.

MOXLEY, R. Enterobacteriaceae: *Escherichia*. In: McVEY, D. S., KENNEDY, M., CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. cap. 7, p. 64-77.

NIPIC, D., PODLESEK, Z., BUDIC, M., CRNIGOJ, M., ZGUR-BERTOK, D. *Escherichia coli* Uropathogenic-Specific Protein, Usp, is a Bacteriocin-Like Genotoxin. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 208, p. 1545-1552, nov. 2013.

PRIEDKALNS, J., LEISER, R. Sistema reprodutivo da fêmea. In: EURELL, J. A., FRAPPIER, B. L. **Histologia Veterinária de Dellmann**. 6 ed. Barueri: Manole, 2012. cap.13, p. 256 – 278.

QUINN, P.J., MARKEY, B. K., CARTER, M. E., DONNELLY, W. J., LEONARD, F. C. Gênero *Staphylococcus*. In: _____. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap 8, p. 55-60.

QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, B., CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. 1. ed. Londres : Wolfe, 1994.

RIBEIRO, M. G., LEITE, D. S., SIQUEIRA, A. K. Enfermidades por *Escherichia coli*. In: MEGID, J., RIBEIRO, M. G., PAES, A. C. **Doenças Infeciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. cap. 25, p. 243-273.

SCHAEFERS-OKKENS, A. C. Ciclo estral e manejo reprodutivo da cadela sadia. In: ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do Cão e do Gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 2 v. cap. 157, p. 1593-1602.

SIQUEIRA, A. K., RIBEIRO, M. G., LEITE, D. S., TIBA, M. R., MOURA, C., LOPES, M. D., PRESTES, N. C., SALERNO, T., SILVA, A. V. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, Londres, v. 86, p. 206-210, jul. 2009.

SMELTZER, M. S., BEENKEN, K. E. *Staphylococcus*. In: In: McVEY, D. S., KENNEDY, M., CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. cap. 26, 189-198.

STEWART, G. C. *Streptococcus e Enterococcus*. In: McVEY, D. S., KENNEDY, M., CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. cap. 27, p. 199-207.

STOUFFER, R. L., BISHOP, C. V., BOGAN, R. L., XU, F., HENNEBOLD, J. D. Endocrine and local control of the primate corpus luteum. **Reproductive Biology**, Olsztyn, v. 13, n. 4, p. 259–271, dez. 2013.

VARELLA, P. P. V., FORTE, W. C. N. Citokines: a review. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

WULLT, B., BERGSTEN, G., SAMUELSSON, M., GEBRETSADIK, N., HULL, R., SVANBORG, C. The role of P fimbriae for colonization and host response induction in the human urinary tract. **The Journal of Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 183, n. Suppl 1, p. S43-S46, 2003.

WYBORN, N. R., CLARK, A., ROBERTS, R. E., JAMIESON, S. J. TZOKOV, S., BULLOUGH, P. A., STILLMAN, T. J., ARTYMIUK, P. J., GALEN, J. E., ZHAO, L., LEVINE, M. M., GREEN, J. Properties of haemolysin E (*HlyE*) from a pathogenic *Escherichia coli* avian isolate and studies of *HlyE* export. **Microbiology Society**, Reading, v. 150, p. 1495-1505, 2004.