ROBERTO RODRIGUES DA ROSA FILHO

Avaliação da hemodinâmica uterina em cadelas com piometra submetidas a diferentes protocolos de tratamento medicamentoso

São Paulo

2019

ROBERTO RODRIGUES DA ROSA FILHO

Avaliação da hemodinâmica uterina em cadelas com piometra submetidas a diferentes protocolos de tratamento medicamentoso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dra. Camila Infantosi Vannucchi

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3845
FMVZ

Rosa Filho, Roberto Rodrigues da
Avaliação da hemodinâmica uterina em cadelas com piometra submetidas a diferentes protocolos de tratamento medicamentos / Roberto Rodrigues da Rosa Filho. – 2019.
106 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Infantosi Vannucchi.

1. Aglepristone. 2. Prostaglandina. 3. Útero. 4. Ultrassonografia. 5. Cistos. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Denise Yamashita, CRB-8/8931, da FMVZ/USP.

ERRATA

ROSA FILHO, R. R. **Avaliação da hemodinâmica uterina em cadelas com piometra submetidas a diferentes protocolos de tratamento medicamentoso**. 2019. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Página	Onde se lê	Leia-se
Ficha Catalográfica	Avaliação da hemodinâmica uterina em cadelas com piometra submetidas a diferentes protocolos de tratamento medicamentos	Avaliação da hemodinâmica uterina em cadelas com piometra submetidas a diferentes protocolos de tratamento medicamentoso

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da hemodinâmica uterina em cadelas com piometra submetidas a distintos protocolos de tratamento medicamentoso", protocolada sob o CEUA nº 5997311017 (ID 004572), sob a responsabilidade de **Camila Infantosi Vannucchi** *e equipe; Roberto Rodrigues da Rosa Filho* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 28/02/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of uterine hemodynamics in bitches with pyometra submitted to different drug treatment protocols", utilizing 40 Dogs (40 females), protocol number CEUA 5997311017 (ID 004572), under the responsibility of **Camila Infantosi Vannucchi** *and team; Roberto Rodrigues da Rosa Filho* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/28/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 12/2017 a 01/2019 Área: Reprodução Animal

Origem:	HOVET/FMVZ/USP						
Espécie:	Cães	sexo:	Fêmeas	idade:	6 a 15 anos	N:	40
Linhagem:	raças variadas			Peso:	5 a 50 kg		

Local do experimento: Laboratório de Inseminação Artificial, Perinatologia e Patologia da Reprodução (HOVET) e Serviço de Obstetrícia e Ginecologia (HOVET)

São Paulo, 02 de julho de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Hospital Veterinário

À Ilustríssima Senhora
Professora Doutora **Camila Infantosi Vannucchi**

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto de pesquisa **"Avaliação da Hemodinâmica uterina em cadelas com piometra submetidas a distintos protocolos de tratamento medicamentoso"**, desenvolvido pelo Médico-Veterinário Roberto Rodrigues da Rosa Filho sob a sua responsabilidade, previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais dessa Faculdade, foi analisado e atende às normas da Comissão de Ética deste Hospital, que acompanhará administrativamente sua execução. Substituição do responsável, inserção de novos colaboradores e mudanças na metodologia proposta deverão ser imediatamente comunicadas a esta Comissão, bem como, as datas de suspensão ou término do projeto.

São Paulo, 10 de maio de 2018.

Prof. Dr. Fernando José Benesi
Presidente da Comissão de Ética Hospitalar
HOVET/FMVZ-USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 – Cidade Universitária Armando de Sales Oliveira
São Paulo/SP – Brasil | CEP 05508-270 | Tel. +55 11 3091-1236 | hovet@usp.br
http://www.hovet.fmvz.usp.br/ | facebook.com/fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ROSA FILHO, Roberto Rodrigues

Título: Avaliação da hemodinâmica uterina em cadelas com piometra submetidas a diferentes protocolos de tratamento medicamentoso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, minha eterna fonte de **AMOR**,*

*À minha irmã, minha eterna fonte de **INSPIRAÇÃO**,*

À minha família...

Aos meus amigos...

Aos meus animais de estimação...

E por fim, a todos os Ginecologistas Veterinários.

AGRADECIMENTOS

Cheguei nesse momento, mas que momento é esse? O **fim**. O fim é um substantivo masculino, que tem por definição “momento ou ponto em que se interrompe algo” ou até mesmo “o que se busca atingir, finalidade, **propósito**”. Mas o caminho para atingir o seu propósito não é fácil, pelo contrário, o caminho é árduo, exaustivo e por muitas vezes eterno. Contudo, este caminho não deve ser percorrido solitariamente, mas sim acompanhado. Durante a minha jornada nestes mais de 2 anos de Mestrado, eu fui muito feliz e privilegiado em ter pessoas que eu pudesse contar e confiar. Cada pessoa descrita aqui nessa redação teve um papel importante para eu atingir o meu propósito.

Essa jornada seria impossível sem o amor incondicional da minha **MÃE**, eu não consigo colocar em palavras ao quanto eu sou grato por tudo que fizestes por mim, nada disso seria possível! A Senhora é a pessoa mais guerreira que conheço, a sua força é imbatível, toda vez que me pego pensando em tudo que já nos aconteceu, eu fico incrédulo com a sua a persistência em continuar seguindo sem pestanejar. Eu tenho certeza que não estaria aonde estou senão fosse por todo seu esforço, TE AMO ETERNAMENTE. Também não seria possível passar por essa fase senão fosse pela existência da minha **IRMÃ**, aí Pavilenne... Você é a minha maior força de inspiração que eu tenho desde criança, a admiração pela primogênita sempre existirá, né?! “***After all this time? ALWAYS”***. Apesar disso, você esteve por mim toda vez que eu precisei e sempre foi a voz da razão quando o caminho se mostrava mais tortuoso do que esperado, TE AMO! À minha madrinha, meu padrinho, as minhas avós e ao meu avô, quero deixar registrado aqui o meu amor por todos eles e a toda minha família que vêm me apoiando ao longo desses anos. Por fim, quero agradecer ao meu **PAI** por me ensinar ao sentimento primordial para realização dessa dissertação, o AMOR pelos animais.

Ao longo desses anos, eu reencontrei e encontrei pessoas fantásticas, e com toda certeza eu aprendi muitos com elas, coisas valiosas saíram do convívio diário, respeito ao próximo em especial...

Para começar, eu preciso falar dessa dupla que me envolveu e que me surpreendeu, porque a minha primeira impressão das duas não era muito boa, mas não devemos julga o livro pela capa, não é mesmo?! Mas deixando as impressões de lado, **Má** e **Lê**, eu sou IMENSAMENTE grato por nossa irmandade, por todos os momentos inusitados, desde as noites de plantão para as noites frustrantes no CA da Vet, são inúmeras histórias que levarei para todo sempre até quando a minha memória permitir ou até o dia que vocês me enxerem demais! Quero agradecer também ao Laboratório de Inseminação Artificial, Perinatologia e **Patologia da Reprodução** e a todos os pós e ex pós-graduandos (Daniel, Thayná, Renata, João, Renato e Patrícia), aos alunos de IC, em especial a Thaís Helena, minha pequena gafanhota, que aceitou entrar nessa aventura do mundo das Pios, você incrível! E aos estagiários que seguravam as pontas quando eu precisava dormir haha.

Falando em LIAPP, não posso de maneira alguma esquecer a pessoa que orienta a nós todos. **Profª Camila**, eu sou eternamente grato à senhora por todo conhecimento transmitido, principalmente pela oportunidade em fazer parte da sua equipe de pesquisa. Apesar de todos apesares durante esse período, acredito que no balanço geral vivemos uma experiência incrível, te levarei como um exemplo profissional e pessoal, muito obrigado!

Para ter tido essa experiência incrível ao lado da Profª Camila, eu tenho que agradecer à pessoa que deu a minha primeira oportunidade de fazer parte do VRA, mesmo como um simplório estagiário lá em 2014. **Profª Cláudia**, eu simplesmente te venero! Não consigo pontuar todos os momentos que tivemos nesse período, desde os atendimentos obstétricos às noites de domingo assistindo o nosso reconfortante GoT, DRACARYS!

Falando em Dracarys, quero agradecer a Drª Carys ou mais conhecida como **Profª Mayra**, especialmente por ter colocado a minha patela no lugar naquele trágico dia lá no inferno na Terra chamado Pirassununga. E ao **Profº Marcílio**, o Neis, obrigado por todas conversas que tivemos ou que eu acho que você estava prestando atenção e claro pela estatística!

Como dito anteriormente, eu reencontrei e encontrei pessoas incríveis nessa jornada, por isso não poderia agradecer ao destino por vocês. Marília, Bobbie, Juji, Carol, Loly, Ewerton Fran, Deninho, Aline, Johny, Aninha e Liti obrigado por todos os momentos.

Quero agradecer ao **VRA** por ser a minha segunda casa durante esse tempo, aos funcionários e prestadores de serviço, em especial a Marie Claire ou Clau por todo apoio técnico ao nosso laboratório, a Loide, Harumi, Roberta, Camilla e Ira. Aos Professores que me ensinaram muito nessa jornada, em especial a Profª Eneiva, Profª Cris Pizzutto, Profº Ricardo, Profº André e Profº Visintin. E aos amigos e colegas pós-graduandos do Departamento!

Em especial gostaria de agradecer a **Profª Clair** pela oportunidade de acompanhar o serviço de Obstetrícia e Ginecologia e por permitir que eu realizasse parte do meu experimento no serviço, com isso agradeço ao pessoal da Obs. Marcelo, Mari, Beth e Nelson obrigado por toda recepção e ajuda ao longo desse tempo.

Ao **Profº Francisco Blazquez** e o Diogo da Anatomia por toda ajuda com toda parte de Histologia desenvolvida nesse projeto.

À **Profª Mariana Veras** por me ensinar muito sobre placenta e por me apresentar e dar suporte com a técnica de Estereologia.

Agradeço ao **Profº Bruno Cogliati** por toda ajuda, paciência e resiliência para com a minha pessoa para confecção das lâminas de Imuno e a Verônica Correia Manuel que no final das contas foi a pessoa iluminada que salvou do VEGF-A.

Apesar de todo apoio institucional, para realização desse projeto foi essencial a colaboração de outras instituições de ensino, quero agradecer a **FMU**, aos residentes e a **Profª Gisele Veiga**, e a **USJT** por confiarem numa pessoa estranha os seus casos de Piometra, MUITO OBRIGADO!

Seria de uma hipocrisia tremenda se eu não agradecesse aos proprietários por confiar os seus animais por um período de tempo tão grande e claro, todas as 17 cadelas que participaram deste projeto.

Agradeço ao **Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal**, a **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** e a **Universidade de São Paulo.**

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

E por fim quero agradecer aos meus guias e a minha pessoa, **Pops!**

"Lost in the city of angels
Down in the comfort of strangers
I found myself in the fire burnt hills
In the land of a billion lights
One life, one love, live
One life, one love, live..."

City of Angels

Thirty Seconds to Mars

"O mundo não se divide em pessoas boas e más. Todos temos Luz e Trevas dentro de nós. O que importa é o lado o qual decidimos agir. Isso é o que realmente somos."

Sirius Black. Harry Potter e a Ordem da Fênix – J.K Rolling, 2003.

RESUMO

ROSA FILHO, R. R. Avaliação da hemodinâmica uterina em cadelas com piometra submetidas a diferentes protocolos de tratamento medicamentoso. 2019. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O complexo hiperplasia endometrial cística - Piometra é uma desordem endometrial das cadelas, sendo a mais comum e importante dentre as afecções uterinas. A ovariohisterectomia é a principal escolha terapêutica, porém, protocolos de tratamento farmacológico surgiram como substitutivos à cirurgia. No entanto, não há estudos que avaliem a hemodinâmica uterina durante o tratamento conservativo, além de características morfométricas uterinas, após distintos tratamentos medicamentosos para piometra. Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar a eficácia do tratamento, a resposta medular, hemodinâmica, vascularização e características morfológicas uterinas após distintos tratamentos medicamentosos para piometra em cadelas. Para tanto, 17 cadelas com diagnóstico de piometra foram alocadas em 3 grupos: controle (submetidas à ovariohisterectomia logo após o diagnóstico), aglepristone (submetidas a protocolo de tratamento com aglepristone na dose de 10 mg/Kg, SID, SC, nos dias 1, 2 e 8 após o diagnóstico) e grupo associação (submetidas a tratamento com aglepristone, além da administração de prostaglandina sintética na dose de 1 µg/kg, SID, IM por 7 dias). A avaliação clínica (FC, FR e temperatura corpórea) foi realizada nos dias 1 e 2 após o diagnóstico, sempre nos seguintes momentos: pré-tratamento, 15 e 60 minutos após aplicação do protocolo terapêutico. Para avaliar o curso dos protocolos de tratamento, foram realizadas análises laboratoriais nos dias 1, 4 e 8 após o início da terapia e avaliações diárias por ultrassonografia modo-B e Dopplervelocimetria das artérias uterinas direita e esquerda. No 9º dia após início do tratamento, as cadelas foram submetidas a ovariohisterectomia e o útero processado para estereologia (morfologia uterina) e imunoistoquímica para expressão do fator VEGF-A. Para a análise temporal, as variáveis clínicas, laboratoriais e ultrassonográficas foram avaliadas pelo teste T de Student e LSD. O efeito dos tratamentos sobre a avaliação do Doppler modo-B e colorido foram analisados pelo teste ANOVA. Para a avaliação de Doppler Espectral, imunoistoquímica e estereologia, os dados foram avaliados pelo teste ANOVA / LSD

na comparação entre os tratamentos, e teste T de Student / Wilcoxon entre os graus de comprometimento da artéria uterina. Foi realizado a análise de correlação utilizando os testes de Pearson e Spearman ($p \leq 0,05$). Na avaliação clínica, o grupo Associação alterou a frequência respiratória até 15 minutos pós-aplicação e houve diminuição da temperatura corpórea entre o 1º e 2º dias. Na avaliação laboratorial, foi observada diminuição dos valores de proteína plasmática no grupo Aglepristone entre o 1º e 4º dia de tratamento e da contagem de leucócitos ao longo do tempo em ambos tratamentos, além de menor contagem de hemácias e hematócrito no grupo Associação. Na avaliação temporal, houve diminuição do perímetro, área e escore de vascularização uterina. O grupo Associação apresentou menor velocidade diastólica final e maior relação sístole:diástole (SD), índice de pulsatilidade (PI) e resistividade (RI), independente do curso da terapia. Ao final do tratamento, os grupos Aglepristone e Associação apresentaram menor perímetro, área e escore de vascularização uterina, assim como menor velocidade diastólica final, além de maior PI, RI e SD, na artéria mais comprometida, em comparação ao Controle. O grupo Aglepristone apresentou menor fração de volume do infiltrado inflamatório e maior fração de volume do estroma uterino. Além disto, houve menores valores de volume e superfície de cistos endometriais e menor expressão do fator VEGF-A no grupo Associação. Em conclusão, a despeito da eficácia dos diferentes tratamentos medicamentosos, o protocolo com Aglepristone é mais eficaz para reversão das alterações clínico-laboratoriais da piometra. Por outro lado, a terapia associativa é mais eficaz em diminuir a vascularização uterina e modular o fluxo sanguíneo e hemodinâmica uterina. Ademais, a terapia medicamentosa em associação do aglepristone e prostaglandina promove alterações morfológicas uterinas, tais como diminuição da quantidade de cistos endometriais, além da diminuição da angiogênese local.

Palavras-chaves: Aglepristone; Prostaglandina; Útero; Ultrassonografia; Cistos

ABSTRACT

ROSA FILHO, R. R**. Evaluation of hemodynamics uterine in pyometra bitches submitted to drug treatment. 2019**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Cystic endometrial hyperplasia - Pyometra complex is a canine endometrial disorder, considered the most common and important among uterine diseases. The treatment of choice is ovariohysterectomy, but medical treatments have become an alternative. However, no studies have been performed in order to evaluate uterine hemodynamic changes during medical treatment, as well as uterine morphometric findings after different medical treatments for pyometra bitches. Therefore, the aim of this study was to compare the effectiveness of two medical protocols by means of medullar response, hemodynamic evaluation, vascularization and uterine morphological changes in pyometra bitches. For such purpose, 17 bitches with pyometra were assigned to 3 groups: Control group (ovariohysterectomy after pyometra diagnosis), Aglepristone group (10 mg/kg aglepristone protocol, SID, SC, on days 1, 2 and 8 after pyometra diagnosis) and Associative group (aglepristone treatment coupled with the administration of 1 µg/kg synthetic prostaglandin, SID, IM for 7 days). Clinical evaluation (HR, RR and body temperature) was performed on days 1 and 2 after pyometra diagnosis, always at the following moments: pre-administration, 15 and 60 minutes after administration of the medical treatment. In order to evaluate the progress of conservative treatment, laboratorial exams were performed on days 1, 4, and 8 after the begging of treatment and daily B-mode ultrasonography, as well as Doppler velocimetry of the right and left uterine arteries. At the 9th day of treatment, bitches were ovariohysterectomized and uterus was processed for stereology (uterine morphology) and immunohistochemistry for VEGF-A. For temporal analysis, clinical, laboratory and ultrasonographic variables were evaluated by Student's T and LSD tests. The effect of treatments on B-mode and color Doppler exams was analyzed by ANOVA test. Spectral Doppler, immunohistochemistry and stereology results were evaluated by ANOVA / LSD to compare the treatments and the Student T / Wilcoxon tests to compare uterine arteries according to degree of hazard. Correlation analysis was performed using Pearson and Spearman tests ($p \leq 0.05$). For clinical evaluation, the Associative group had altered respiratory rate between 0 and 15 minutes after drug

administration and decreased body temperature between the 1st and 2nd days. For laboratory evaluation, a decrease in plasma protein was observed in Aglepristone group between the 1st and 4th days of treatment and leukocyte count over time for both therapeutic protocols, in addition to lower red blood cell count and hematocrit in Associative group. For temporal evaluation, there was a significant decrease in uterine perimeter, area and vascularization score. The Associative group had lower final diastolic velocity and higher systole: diastole ratio (SD), pulsatility index (PI) and resistance index (RI). At the end of treatment, Aglepristone and Associative groups had lower uterine perimeter, area and vascularization score, as well as lower final diastolic velocity and higher values of PI, RI and SD in the more affected artery compared to the Control group. The Aglepristone group presented lower fraction volume of inflammatory infiltrate and larger fraction volume of uterine stroma. In addition, the Associative group had lower volume and surface values of endometrial cysts and VEGF-A expression. In conclusion, different medical treatments, specially the Aglepristone protocol, are effective in reversing clinical and laboratory alterations of pyometra. Conversely, Associative therapy is more effective in decreasing uterine vascularization and modulating uterine blood flow and hemodynamics. Moreover, associative medical therapy with aglepristone and prostaglandin was able to promote morphological changes such as decreased number of endometrial cysts and local angiogenesis.

Key-words: Aglepristone; Prostaglandin; Uterus; Ultrassonography; Cysts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Distensão abdominal em piometra de cérvix fechada; (B) Descarga vaginal purulenta em piometra de cérvix aberta. 31
Figura 2 - (A) Acúmulo intenso de conteúdo anecogênico em lúmen uterino em corte longitudinal; (B) Acúmulo intenso de conteúdo anecogênico em lúmen uterino em corte transversal; (C) Acúmulo moderado de conteúdo anecogênico em lúmen uterino em corte transversal; (D) Acúmulo leve de conteúdo anecogênico em lúmen uterino em corte tranversal. 33
Figura 3 - Avaliação ultrassonográfica bidimensional (5 Mhz) do corno uterino em corte transversal. (+) Mensuração (cm) da altura do corno uterino e (x) mensuração (cm) da largura do corno uterino. 42
Figura 4 – Avaliação ultrassonográfica dos cornos uterinos por Doppler colorido em corte transversal. Escore de vascularização de 1 a 3. 43
Figura 5 - Delineamento experimental adotado para o Capítulo 1. 46
Figura 6 – Média e erro padrão da frequência respiratória (mpm) nos grupos Aglepristone e Associação após aplicação do protocolo de tratamento. 48
Figura 7 – Média e erro padrão da temperatura corpórea (oC) das cadelas do grupo Associação ao longo do tratamento. 48
Figura 8 – Média e erro padrão da concentração da proteína plasmática total (g/dL) nos grupos Aglepristone e Associação durante o período experimental. 50
Figura 9 – Média e erro padrão da contagem de leucócitos (mm3) durante o período experimental. 51
Figura 10 – Média e erro padrão para a contagem de hemácias (He, 106/mm3) e hematócrito (Ht, %). Nos distintos grupos experimentais. 51
Figura 11 – Média e erro padrão da área (cm²) dos cornos uterinos nos distintos grupos experimentais ao longo do período de tratamento. 52
Figura 12 - Média e erro padrão do perímetro (cm) dos cornos uterinos nos distintos grupos experimentais ao longo do período de tratamento. 53
Figura 13 – Média e erro padrão do escore de vascularização (0-3) ao longo do período experimental. 53
Figura 14 – Média e erro padrão da velocidade diastólica final (ED; cm/s) e relação sístole:diástole (SD; cm/s) ao longo do período experimental. 54

Figura 15 – Média e erro padrão do índice de pulsatilidade e resistividade ao longo do período experimental. 54
Figura 16 – Média e erro padrão da velocidade diastólica final (ED) e relação sístole:diástole (SD) nos distintos grupos experimentais. 55
Figura 17 - Média e erro padrão do índice de pulsatilidade e resistividade nos distintos grupos experimentais. 55
Figura 18 – Correlações entre variáveis experimentais para o Grupo Aglepristone.. 57
Figura 19 – Correlações entre variáveis experimentais para o Grupo Associação. .. 58
Figura 20 – Sistemática para a amostragem uniforme e randômica dos fragmentos dos cornos uterinos submetidos à avaliação esterológica (SUR). 68
Figura 21 - Visibilização do corte histológico com auxílio do software Zen Blue 2.6®. 69
Figura 22 – (A) Regiões do corno uterino: miométrio (M), endométrio (E) e cisto (C). Coloração HE em aumento 4x. (B) Estimativa do miométrio (M), endométrio (E) e cisto (C). Geração de sistemas teste com auxílio software Image J®. Coloração HE em aumento de 4x. 70
Figura 23 – (A) Fotomicrografia de superfície de contato das estruturas endometriais com auxílio do software Image J®, para estimativa da composição tecidual do endométrio. Coloração HE em aumento 20x. (B) Contagem das intersecções entre os arcos cicloides e a região luminal das estruturas, para estimativa da área de superfície das estruturas endometriais. Geração de sistemas teste com auxílio do *software* Image J®. Coloração HE em aumento 20x. 71
Figura 24 - Delineamento experimental adotado no Capítulo 2. 75
Figura 25 - Média e erro padrão da área (cm²) e perímetro uterino (cm) nos distintos grupos experimentais. 77
Figura 26 – Média e erro padrão de escore de vascularização (0-3) nos distintos grupos experimentais. 77
Figura 27 – Média e erro padrão do pico da velocidade sistólica (PS), velocidade diastólica final (ED) e velocidade média de um ciclo cardíaco (TAMAX) nos distintos grupos experimentais. 78
Figura 28 - Média e erro padrão do índice de pulsatilidade (PI), índice de resistividade (RI) e relação sístole/diástole (S/D) nos distintos grupos experimentais. 79
Figura 29 – Média e erro padrão da densidade específica dor cornos uterinos nos distintos grupos experimentais. 80

Figura 30 - Média e erro padrão da fração de volume (Vv) do infiltrado inflamatório (Ii) nos distintos grupos experimentais. 81
Figura 31 – Mediana e quartis (q1;q3) da fração de volume (Vv) do estroma uterino (Es) nos distintos grupos experimentais.....82
Figura 32 – Mediana e quartis (q1;q3) da fração de volume (Vv), volume total (VT), densidade de superfície (Sv) e área de superfície absoluta (SV) e do cisto (Ci) nos distintos grupos experimentais. 83
Figura 33 – Mediana e quartis (q1;q3) da fração de volume (Vv) e volume total (VT) do edema uterino (Ed) nos distintos graus de acometimento. 83
Figura 34 – Média e erro padrão da expressão do VEGF-A em diferentes regiões uterinas nos distintos grupos experimentais.....84
Figura 35 - Correlações entre variáveis-respostas para os distintos grupos experimentais. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição da raça e idade das fêmeas constituintes dos grupos experimentais. 40
Tabela 2 - Poder do Teste e respectivas unidades experimentais (n) nos grupos experimentais (Aglepristone e Associação) para as variáveis de índice de resistividade da artéria direita e esquerda.....41
Tabela 3 - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Aglepristone VS. Associação), dias de tratamento (1 e 2) e momento de avaliação clínica após aplicação (0, 15 e 60 minutos). 46
Tabela 4 - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Aglepristone VS. Associação) e dias de tratamento (1, 4 e 8 dias após o diagnóstico).....47
Tabela 5 - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Aglepristone VS. Associação) e dias de tratamento (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 dias após o diagnóstico)....47
Tabela 6 - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Aglepristone VS. Associação), dias de tratamento (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 após o diagnóstico) e o Grau de acometimento (mais e menos acometida).....47
Tabela 7 – Média e erro padrão da frequência cardíaca (bpm) e temperatura corpórea (oC) nos distintos grupos experimentais. 49
Tabela 8 - Média e erro padrão da frequência cardíaca (bpm) e temperatura corpórea (oC) até 60 minutos após a aplicação do protocolo terapêutico.....49
Tabela 9 - Média e erro padrão da frequência cardíaca (bpm) até 2 dias após o diagnóstico e instituição do protocolo terapêutico. 49
Tabela 10 - Média e erro padrão da contagem de leucócitos (mm3) nos distintos grupos experimentais. 51
Tabela 11 - Média e erro padrão para a contagem de hemácias (He, 106/mm3) e hematócrito (Ht, %) ao longo do tratamento.....51
Tabela 12 - Descrição da raça e idade das fêmeas constituintes dos grupos experimentais. 66
Tabela 13 - Poder do Teste e respectivas unidades experimentais (n) nos grupos experimentais (Aglepristone, Associação e Controle) para as variáveis de índice de resistividade da artéria direita e esquerda.....67

Tabela 14 - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Aglepristone VS. Associação VS. Controle) e e o Grau de acometimento (mais e menos acometida). 75
Tabela 15 - Média e erro padrão da fração de volume (Vv) e Volume Total (VT) nos distintos grupos experimentais. 80
Tabela 16 - Média e erro padrão da fração de volume (Vv) e Volume Total (VT) nos distintos graus acometimento. 81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação histológica dos distúrbios uterinos nas cadelas 29
Quadro 2 - Número de ocorrência de sinais clínicos adversos nos momentos 15 e 60 minutos após a administração do protocolo de tratamento no Grupo Associação. ...49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 24

2 REVISÃO DE LITERATURA 27

2.1 ETIOPATOGENIA 27
2.2 CLASSIFICAÇÃO 28
2.3 DIAGNÓSTICO 30
2.3.1 Anamnese e Exame Físico 30
2.3.2 Exames Laboratoriais 31
2.3.3 Ultrassonografia transabdominal 32
2.3 TRATAMENTO 34

3 HIPÓTESE 37

4 CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS MEDICAMENTOSOS PARA PIOMETRA DURANTE O CURSO TERAPÊUTICO (ANÁLISE TEMPORAL) EM CADELAS 39

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS 39
4.1.1 Animais e grupos experimentais 39
4.1.2 Análise do poder do teste 41
4.1.3 Avaliação Clínica e Laboratorial 41
4.1.4 Avaliação Ultrassonográfica 42
4.1.4.1 Avaliação Ultrassonográfica Bidimensional 42
4.1.4.2 Avaliação Ultrassonográfica por Doppler Colorido 43
4.1.4.3 Avaliação Ultrassonográfica por Doppler Espectral 43
4.1.5 Análise Estatística 44
4.1.6 Delineamento Experimental Capítulo 1 45
4.2 RESULTADOS 46
4.2.1 Interações Estatísticas 46
4.2.2 Avaliação Clínica 47
4.2.3 Avaliação Laboratorial 50
4.2.4 Avaliação Ultrassonográfica 52
4.2.5 Análise de Correlação 55
4.3 DISCUSSÃO 59

5 CAPÍTULO 2 – EFEITO DOS TRATAMENTOS MEDICAMENTOSOS PARA PIOMETRA SOBRE A MORFOLOGIA E HEMODINÂMICA UTERINA EM CADELAS 65

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS 65
5.1.1 Animais e grupos experimentais 65
5.1.2 Análise do Poder de Teste 66
5.1.3 Avaliação Ultrassonográfica 67

5.1.4 Avaliação Estereológica Uterina 67
5.1.4.1 Volume Total do Cornos Uterinos 67
5.1.4.2 Processamento das amostras 67
5.1.4.3 Volume das Regiões Uterinas 68
5.1.4.4 Composição Volumétrica das Estruturas Endometriais 70
5.1.4.5 Área de Superfície de Contato das Estruturas Endometriais 71
5.1.6 Análise Estatística 74
5.1.7 Delineamento Experimental do Capítulo 2 74
5.2 RESULTADOS 75
5.2.1 Interações Estatísticas 75
5.2.2 Avaliação Ultrassonográfica 76
5.2.3 Avaliação Estereológica 79
5.2.3 Avaliação Imunohistoquímica para o VEGF-A 83
5.2.4 Análise de Correlação 84
5.3 DISCUSSÃO 86

6 CONCLUSÕES 91

REFERÊNCIAS 93

APÊNDICE A – ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS DO GRUPO AGLEPRISTONE. 102

APÊNDICE B – ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS DO GRUPO ASSOCIAÇÃO. 103

ANEXO A – TERAPIA DE SUPORTE PARA A PIOMETRA CANINA 105

ANEXO B – VALORES DE REFERÊNCIA ADOTADOS PELO SERVIÇO DE LABORATÓRIO CLÍNICO DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA DA FMVZ-USP. 106

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

No que corresponde ao atendimento de moléstias cirúrgicas em pequenos animais, as afecções relativas ao trato genito-urinário correspondem a cerca de 16% e 18% da casuística total de atendimentos na espécie canina e felina, respectivamente. Portanto, as afecções reprodutivas são consideradas a segunda maior frequência de casos, inferior apenas às afecções do sistema locomotor (CRUZ-PINTO *et al*., 2015). Dentre as enfermidades uterinas na espécie canina, o complexo hiperplasia endometrial cística–Piometra (HEC-Piometra), desordem endometrial das cadelas, é considerada a mais comum e importante (BIGLIARDI *et al.*, 2004).

Conforme DOW (1960), os primeiros relatos de HEC-Piometra em cadelas datam do início do século XIX, quando pouquíssimos relatos sobre afecções ginecológicas eram descritos. Com o passar do tempo, tal afecção recebeu várias e diferentes nomenclaturas, tais como piometrite, complexo piometra, endometrite catarral, endometrite purulenta, endometrite cística crônica e endometrite purulenta crônica (JOHNSTON, KUSTRITZ e OLSON, 2001).

Baithalu *et al.* (2010) definem a piometra como o acúmulo de secreção pio-sanguínea no lúmen uterino, manifestando-se durante ou imediatamente após o período de elevada concentração de progesterona circulante. Cerca de ¼ da população de cadelas não-castradas são diagnosticadas com piometra antes mesmo de 10 anos de idade, sendo o risco superior a 50% em algumas raças (HAGMAN, 2012). Mesmo sendo uma desordem de origem endometrial, a piometra não promove apenas alterações locais, mas também distúrbios sistêmicos importantes, comprometendo, assim, outros órgãos (PRASAD, KUMAR e SREENU, 2017). Diante desta característica, a piometra é considerada uma doença de caráter emergencial (HAGMAN, 2018). No entanto, mesmo quando não há rápida intervenção médica, a taxa de mortalidade varia entre 3 a 10% (EGENVALL *et al*., 2001; JITPEAN *et al*., 2014).

De acordo com a literatura, a principal terapia aplicada a esta desordem é a cirúrgica, pois tem como vantagem a rápida resolução, além de ser a melhor escolha terapêutica nos casos de peritonite e para cadelas de qualquer idade (VEIGA *et al.*, 2013). No entanto, há riscos cirúrgicos e anestésicos, além de incapacidade reprodutiva da cadela após o procedimento, mesmo havendo baixa taxa de mortalidade (JITPEAN et al., 2014). Entretanto, com o passar dos anos, alternativas

terapêuticas foram desenvolvidas, com intuito de manter a capacidade reprodutiva de matrizes ou para situações nas quais o procedimento é contraindicado (condições clínicas desfavoráveis para anestesia ou cadelas idosas) e restrições financeiras dos proprietários (FIENI, TOPIE e GOGNY, 2014).

Os principais fármacos utilizados para a terapia medicamentosa da HEC-piometra são a PGF2-α e o aglepristone, isolados ou em associação (FIENI, 2014). O tratamento com PGF-2α tem como objetivo promover a luteólise e contração uterina, a despeito de muitos efeitos adversos (FIENI, TOPIE e GOGNY, 2014). Para tanto, o aglepristone (RU46534) surgiu como nova possibilidade para terapia da piometra, pois promove relaxamento cervical pela ação competidora aos receptores de progesterona (FIENI, 2006). Outros anti-progestágenos também podem ser empregados, tais como o mifepristone (RU38486) e onapristone (ZK98299), porém, o aglepristone é a única droga registrada para utilização em Medicina Veterinária (JURKA *et al*., 2010). Independente do protocolo medicamentoso ou cirúrgico, faz-se obrigatório a utilização do tratamento suporte, baseado principalmente na fluidoterapia e antibioticoterapia (FIENI, TOPIE e GOGNY, 2014).

Diversas pesquisas foram realizadas no sentido de tentar elucidar os mecanismos envolvidos no complexo HEC-Piometra, porém, alguns questionamentos permanecem, especialmente em relação à etiopatogenia, formas terapêuticas e resposta aos distintos modos de tratamento.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOPATOGENIA

A HEC-Piometra acomete obrigatoriamente em cadelas não castradas (SMITH, 2006), geralmente durante o diestro do ciclo estral, com alta incidência em fêmeas até 10 anos de idade (BAITHALU *et al*., 2010). Há predisposição racial para as cadelas das raças Rottweiler, Pastor Alemão e Golden Retriever (SMITH, 2006). De acordo com Veiga *et al.* (2013), não há estudos que relacionam outros fatores de risco, tais como o histórico de pseudociese, idade ao primeiro cio e intervalo entre estros.

A etiologia da piometra permanece obscura, porém, acredita-se que as alterações estruturais do endométrio estejam relacionadas à exposição inicial ao estrógeno e, posteriormente, ao longo período de exposição à progesterona (SMITH, 2006; JOHNSTON *et al.*, 2001). De forma geral, a exposição alternada a tais esteróides tornaria o útero mais susceptível à ação de microrganismos (JOHNSTON *et al.*, 2001). De acordo com Sigiura *et al*. (2004), a alta concentração de progesterona durante o início do diestro causa supressão da resposta celular ao antígeno-específico Th1, consequentemente diminuindo a produção de interferon do tipo γ, o qual promove ativação da fagocitose. Outro fator relativo à imunossupressão uterina é a inibição da maturação de células dendríticas pela alta concentração de progesterona no diestro (WIJEWARDANA *et al*., 2015).

É possível destacar, ademais, outros eventos relacionados ao desenvolvimento da doença, tais como a desregulação do mecanismo de controle de proliferação e apoptose celular (REUSCHE *et al*. 2018). Além disto, de acordo com Gultiken *et al*. (2016), há maior expressão de 3β-Hidroxiesteróide Desidrogenase no epitélio luminal e glandular em cadelas com complexo hiperplasia endometrial cística – piometra. Infere-se também haver relação entre o aumento da expressão do fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I) e eventos endometriais (MURPHY e GHAHARY, 1990) e o desenvolvimento da HEC-Piometra, uma vez que foi evidenciada maior expressão do IGF-I em cadelas com HEC-Piometra, comparando-se às cadelas em diestro (COCK *et al*., 2002).

O principal agente microbiológico isolado de secreções provenientes de cadelas com piometra é a *Escherichia Coli* Gram- (DOW, 1959; COGGAN *et al.*, 2008).

A principal via de contaminação é ascendente, tendo como origem o trato urinário inferior e genitália externa (FRANSOON *et al.*, 1997). De acordo com a literatura, a *E. Coli* pode produzir a toxina α-hemolisina, a qual é capaz de reduzir a expressão de citocinas no endométrio, permitindo o estabelecimento bacteriano prévio à ativação da resposta imunológica (HENRIQUES *et al*., 2016). Em associação, há maior expressão de mRNA do receptor *scavenger* classe B tipo 1 (SR-B1) em cadelas com piometra (GABRIEL *et al*., 2016), em resposta ao patógeno e, portanto, a possibilidade do desenvolvimento da afecção. Ademais, a *E. Coli* está associada à regulação da resposta inflamatória local pela elevada concentração de Prostaglandina (PG) F2α e PGE_2, resultando em maior expressão gênica para PG (SILVA *et al*., 2012). Desta forma, são necessários mais estudos para comprovar o crescimento bacteriano sob a forma de biofilme como importante fator para manutenção da doença (HAGMAN, 2017).

2.2 CLASSIFICAÇÃO

Em literatura especializada, a HEC-Piometra pode ser classificada de duas formas: quanto à patência do colo uterino ou em relação ao aspecto histológico das camadas uterinas. A primeira classificação define a piometra em cérvix fechada (ausência de descarga vaginal) e piometra de cérvix aberta (presença de descarga vaginal) (BAITHALU *et al.*, 2010; SMITH, 2006). De acordo com Jitpean et al. (2017), a piometra de cérvix aberta é a mais comum na rotina clínica, alcançando 65% dos casos.

Nas cadelas com piometra de cérvix aberta, foi evidenciada maior concentração de colágeno na cérvix, em comparação às cadelas com piometra fechada (LINHARATTANARUKSA *et al*., 2013). Ademais, há maior expressão de interleucina-8 (IL-8) na cérvix, a qual promove consequente atração de neutrófilos, gerando degradação de colágeno e remodelação de tecido conjuntivo (TAMADA *et al*., 2012). Não obstante, há possibilidade do envolvimento de aminoglicanos altamente sulfatados, tais como o sulfato de queratina e hialuronana, com citocinas locais produzidas por neutrófilos na patência cervical (LINHARATTANARUKSA *et al*., 2013). Recentemente, foi observado que a patência cervical relaciona-se à maior expressão dos genes de ciclooxigenase-2 (COX-2) e PGE-sintase em cadelas com piometra de cérvix aberta (TAMADA *et al*., 2016). Por outro lado, foi verificado por

Volpato *et al*. (2012) haver maiores concentrações de receptores de progesterona e estrógeno no útero e cérvix de cadelas com piometra de cérvix fechada.

A segunda classificação para a HEC-piometra, inicialmente descrita por Dow (1959) (Quadro 1), refere-se às lesões histológicas uterinas, posteriormente modificadas por De Bosschere *et al.* (2001), os quais descrevem lesões independentes (não representam uma sequência de eventos) em dois grandes grupos: HEC-mucometra (HEC moderada, HEC severa e mucometra) e endometrite-piometra (endometrite, piometra hiperplásica e piometra atrófica), esta última representada pela presença de infiltrado inflamatório.

Atualmente, foi comprovado que, além das alterações histológicas descritas por De Bosschere *et a*l. (2001), há alterações inflamatórias (COX-2), de proliferação celular (Ki-67) e mediadores de angiogênese (VEGF-A, FLT-1 e KDR), sendo mais expressos na piometra do que na mucometra (VEIGA *et al*., 2017). Ademais, Singh et al. (2018) observaram maior expressão de citocinas inflamatórias em piometras atróficas em comparação à piometra hiperplásica.

Quadro 1 - Classificação histológica dos distúrbios uterinos nas cadelas

CLASSIFICAÇÃO	HISTOLOGIA UTERINA
HEC não complicada	• Hipertrofia glandular • Cistos de até 1cm de diâmetro • Ausência de reação inflamatória
HEC complicada	• Infiltrado de células plasmocitárias difuso no estroma, criptas e zonas subepiteliais do endométrio
HEC com endometrite aguda	• Infiltrado de polimorfonucleares nas criptas e camadas profundas do endométrio • Abscessos ao redor das glândulas • Inflamação no miométrio
HEC com endometrite crônica	• Hipertrofia ou atrofia miometrial e fibrose • Poucas glândulas endometriais • Infiltrado linfocítico e plasmocítico

Fonte: DOWN (1959).

2.3 DIAGNÓSTICO

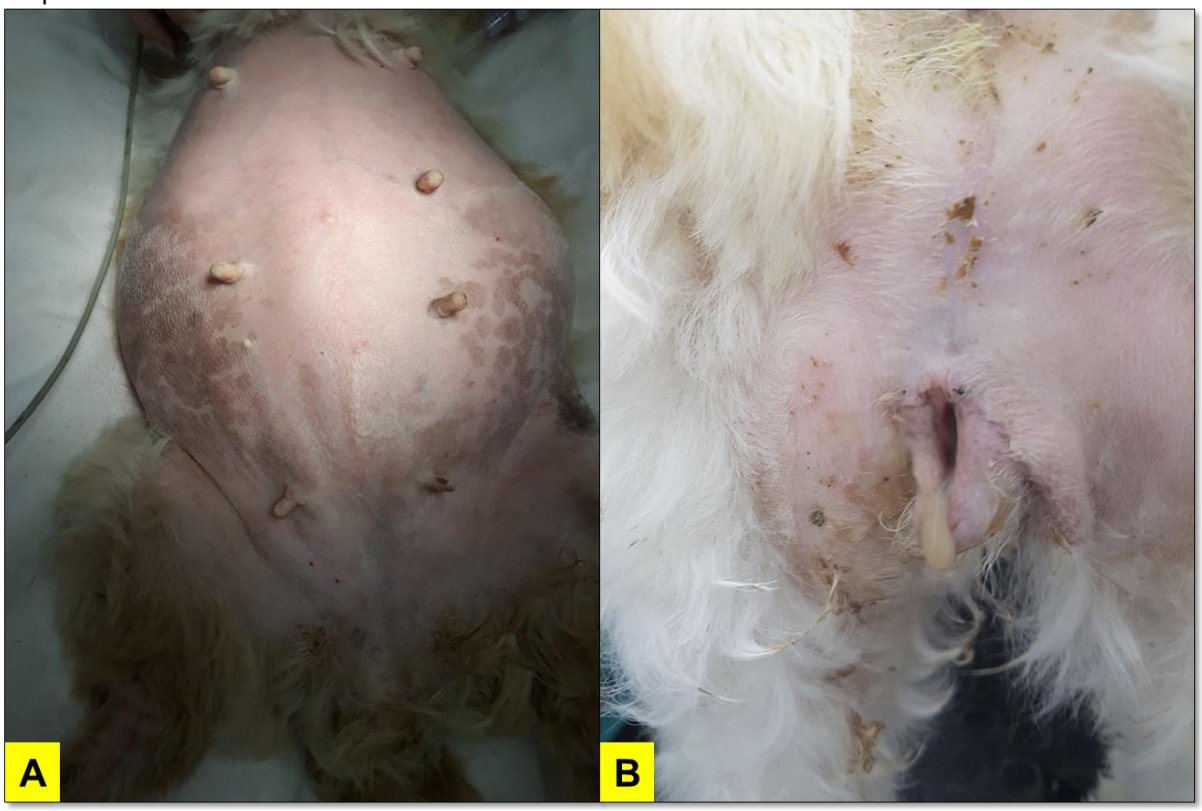
O diagnóstico da piometra é realizado por meio dos dados da anamnese, exame físico, exames laboratoriais (PRETZER, 2008) e principalmente, por exames de imagem, especialmente a ultrassonagrafia (BIGLIARDI *et al.*, 2004).

2.3.1 Anamnese e Exame Físico

As principais queixas do proprietário são apatia, letargia, depressão, inapetência ou anorexia, desidratação, diarreia e êmese (PRETZER,2008; VEIGA *et al*., 2013). A polidipsia/poliúria é comumente citada como sinal clínico (SMITH, 2006; PRETZER,2008; BAITHALU *et al*., 2010), no entanto, apenas ≤50% dos casos de piometra apresentam tal alteração clínica (VERSTEGEN, DHALIWAL e VERSTEGEN-ONCLIN, 2008). De acordo com Sorribas (2009), 20% das cadelas apresentam hipertermia, porém quadros de hipotermia podem estar associados à toxemia (BAITHALU *et al*, 2010). Tais alterações geralmente são manifestadas após 4 semanas até 4 meses da fase do estro (SMITH, 2006).

A distensão abdominal é principalmente observada nos casos de piometra de cérvix fechada e, em alguns casos, descarga vaginal de aspecto muco-purulento ou pio-sanguíneo nos casos de piometra de cérvix aberta (Figura 1) (SMITH, 2006; BAITHALU *et al*, 2010).

Figura 1 – (A) Distensão abdominal em piometra de cérvix fechada; (B) Descarga vaginal purulenta em piometra de cérvix aberta.



Fonte: (A) Arquivo pessoal (2019). (B) Laboratório de Inseminação Artificial, Perinatologia e Patologia da Reprodução (2018).

2.3.2 Exames Laboratoriais

Os exames subsidiários laboratoriais devem ser considerados para o correto diagnóstico e condução terapêutica nos casos de piometra (KAYMAZ *et al*., 1997). Os principais achados do eritrograma são a redução dos valores de hemácia, hemoglobina e hematócrito, resultando em anemia arregenerativa, normocítica e normocrômica (SHAH *et al*., 2017), decorrente da toxina bacteriana e inflamação crônica na medula óssea (KÜPÜPÜ *et al*., 2009). A leucocitose é o principal achado no leucograma (HAGMAN, 2018), acompanhado de neutrofilia, linfopenia, monocitose e, eventualmente, desvio à esquerda em casos crônicos (FALDYNA, LAZNICKA e TOMAN, 2001; SHAH *et al*., 2017). Jitpean *et al*. (2017) consideram tais achados laboratoriais mais comuns e severos nas cadelas com piometra de cérvix fechada. A hiperproteinemia encontrada na piometra é subsequente ao aumento da concentração sérica de imunoglobulinas (Ig) (FALDYNA, LAZNICKA e TOMAN, 2001).

Comumente, a piometra eleva as concentrações séricas das enzimas fosfatase alcalina (FA) e aspartato amino-transferase (AST) (PATIL *et al*., 2013;

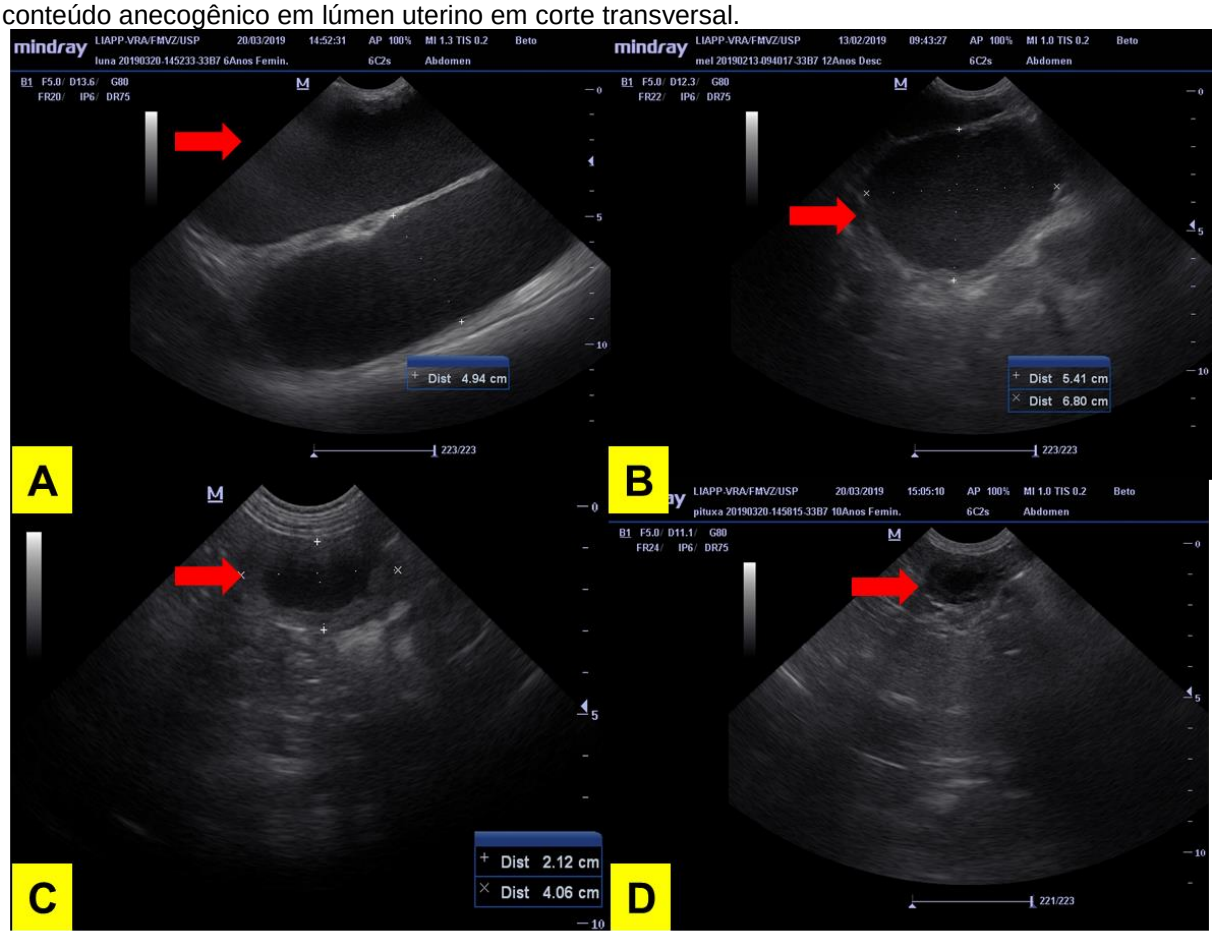
VEIGA *et al*., 2013). Todavia, a elevação da enzima alanina amino-transferase (ALT) pode ocorrer em 50-75% dos casos, por reflexo da toxemia e/ou desidratação (VERSTEGEN, DHALIWAL e VERSTEGEN-ONCLIN, 2008).

A azotemia renal decorre do aumento da ureia nitrogenada e creatinina, por ação secundária das toxinas bacterianas nos néfrons, tanto na região glomerular quanto na região de túbulo proximal (MADENS *et al*., 2010). É considerada uma das alterações mais significativas na bioquímica sérica (GUPTA *et al*., 2013). Estudo recente demonstrou que é possível diagnosticar lesões renais em cadelas com piometra previamente ao desenvolvimento da azotemia, por meio da análise da relação proteína-creatinina (UPC) urinária acompanhada da urinálise (SANT'ANNA *et al*., 2019).

2.3.3 Ultrassonografia transabdominal

O primeiro relato da utilização da ultrassonografia no modo – B para diagnóstico precoce de piometra foi realizado em 1991 por FAYRER-HOSKEN *et al*., sendo visibilizado conteúdo anecóico – hipoecóico no lúmen uterino (CRUZ-ARÁMBULO e WRIGLEY, 2003), conforme ilustrado na figura 2. Atualmente, a avaliação ultrassonográfica é a ferramenta mais utilizada pelo ginecologista veterinário para o diagnóstico da HEC-piometra (YOUNIS *et al.*, 2014), pois é possível a identificação das formas diagnósticas propostas por De Bosschere *et al.* (2001): mucometra, endometrite, piometra hiperplásica e piometra atrófica, além da classificação sugerida por Dow (1959): HEC com endometrite aguda e crônica (BIGLIARDI *et al*., 2004).

Figura 2 - (A) Acúmulo intenso de conteúdo anecogênico em lúmen uterino em corte longitudinal; (B) Acúmulo intenso de conteúdo anecogênico em lúmen uterino em corte transversal; (C) Acúmulo moderado de conteúdo anecogênico em lúmen uterino em corte transversal; (D) Acúmulo leve de conteúdo anecogênico em lúmen uterino em corte transversal.



Fonte: Laboratório de Inseminação Artificial, Perinatologia e Patologia da Reprodução (2018).
Setas vermelhas indicam conteúdo anecogênico em lúmen uterino.

A ultrassonografia Doppler é uma ferramenta não invasiva a qual fornece informações importantes sobre a perfusão tecidual e tem como objetivo detalhar a arquitetura e aspectos hemodinâmicos dos vasos (FIELDER e BAKER, 1969; FIGUEIRA *et al*., 2008). Contudo, a utilização da ultrassonografia Doppler em Medicina Veterinária é relativamente nova comparando-se à Medicina. Em relação às doenças uterinas em cadelas, há diferenças na perfusão da artéria uterina, representadas, especialmente, por aumento de fluxo sanguíneo (BATISTA *et al*., 2016) e diminuição da resistência vascular (VEIGA *et al*., 2017) nas cadelas com piometra.

2.3 TRATAMENTO

A ovariohisterectomia (OHE) é o tratamento de eleição para cadelas com piometra de cérvix fechada ou alterações sistêmicas importantes (VEIGA *et al.*, 2013), tais como disfunções renais e hepáticas, hipertermia ou hipotermia associada à suspeita de peritonite (FIENI, 2006). Observa-se baixa taxa de mortalidade pós-cirúrgica (1%) (JITPEAN et al., 2014), além de favorável recuperação clínica, principalmente relativa a alterações hematológicas (BARTOSKOVA *et al*., 2007). O leucograma é ótimo preditor do prognóstico pós-operatório (JITPEAN et al., 2014), pois a leucopenia é um fator relacionado à peritonite e maior tempo de hospitalização no pós-cirúrgico. Após 10 dias do procedimento cirúrgico, há diminuição dos valores de citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-10) (DĄBROWSKI *et al*., 2015a) e proteína C-reativa (DĄBROWSKI *et al*., 2015b).

Como alternativa ao tratamento cirúrgico, diversos estudos propõem combinações farmacológicas indicadas para fêmeas reprodutoras ou para as quais o procedimento cirúrgico é contraindicado (condições clínicas desfavoráveis para anestesia ou cadelas idosas) e restrições financeiras dos proprietários (FIENI, TOPIE e GOGNY, 2014).

São vários os fármacos utilizados nos protocolos de tratamento medicamentoso para piometra, entre eles a prostaglandina F2-α, natural ou sintética (JENA *et al*., 2013). Pode-se preconizar o uso da PF2-α de forma isolada ou em associação aos inibidores de prolactina (tal como a cabergolina; CORRADA *et al.*, 2006; ENGLAND, FREEMAN e RUSSO, 2007), antiprogestágenos (tal como o aglepristone; FIENI, 2006) e até mesmo aos antagonistas de GnRH (tal como a acilina; BATISTA et al., 2015). Não obstante, os principais fármacos utilizados são a PGF2-α e o aglepristone, isolados ou em associação (FIENI, 2014).

O tratamento com PGF-2α tem como objetivo promover a luteólise e contração uterina em cadelas jovens com piometra de colo uterino aberto e funções renais e hepáticas dentro da normalidade (FIENI, TOPIE e GOGNY, 2014). Os principais efeitos colaterais do uso deste fármaco são a hipotermia, aumento da frequência de defecação/diarreia, sialorréia ou êmese, depressão ou excitação (FIENI, TOPIE e GOGNY, 2014).

Recentemente, estudos indicam a eficácia da administração do aglepristone, substância agonista competitiva ao receptor de progesterona, levando à

diminuição dos efeitos intrauterinos da progesterona (DOMOSŁAWSKA, JANOWSKI e JURCZAK, 2010; JENA *et al.*, 2013; ROS, HOLST e HAGMAN, 2014; CONTRI *et al.*, 2015). O tratamento com aglepristone pode ser recomendado para a piometra de colo uterino fechado, porém, é contraindicado para cadelas com disfunções hepáticas e renais, diabéticas e insuficiência da glândula adrenal (FIENI, 2006; JURKA *et al.*, 2010).

Diversos estudos verificaram a eficiência dos protocolos de tratamento medicamentoso para a piometra em cadelas (GOBELLO *et al*., 2003; TRASCH, WEHREND e BOSTEDT, 2003; GÜRBULAK et al., 2005; CORRADA et al., 2006; FIENI, 2006; ENGLAND *et al*., 2007; UÇMAK e TEK, 2008; JENA *et al*., 2013; ROS, HOLST e HAGMAN, 2014; BATISTA et al., 2015; CONTRI *et al*., 2015). É possível destacar o esquema terapêutico utilizando aglepristone nos dias 0, 2, 5 e 8 pós diagnóstico, relatado como 100% eficaz (CONTRI *et al.,* 2015). Atualmente, não há estudos que verifiquem os efeitos dos distintos tratamentos para piometra com ênfase nos aspectos vasculares e morfológicos do útero.

Independente do protocolo medicamentoso ou cirúrgico, faz-se obrigatório a utilização do tratamento suporte, baseado principalmente na fluidoterapia e antibioticoterapia (FIENI, TOPIE e GOGNY, 2014). Distintos protocolos de suporte são relatados em literatura, tais como a utilização de amoxicilina associada ao clavulanato (CONTRI *et al*., 2015) ou Sulfadozina associada ao Trimetropim (FIENI, 2006). De acordo com Coggan *et al*. (2008), a *E. Coli* é sensível principalmente ao Norfloxacino (94%), Polimixina B (82,8%) e Enrofloxacino (75,5%), além de 100% sensível à Fosfomicina (INOUE, SHIBATA E FUKATA, 2012). No entanto, recentemente, preconiza-se a Eritromicina (100% de sensibilidade), além do Cloranfenicol (94,68%), Levofloxacina (91,66%) e Enrofloxacino (88,54%) (BERL *et al*., 2018). Ao encontro disto, Coggan *et al*. (2008) observaram alta taxa de resistência ao efeito da *E. Coli,* para a Cefalotina (86,1%) e Ampicilina (46,4%).

HIPÓTESE

3 HIPÓTESE

1) Os tratamentos medicamentosos para a piometra canina restabelecem a hemodinâmica uterina e diminuem a angiogênese local, além de promoverem mudanças morfológicas e estruturais do tecido uterino.
2) O tratamento associativo entre o aglepristone e prostaglandina possui maior eficácia em relação à terapia isolada com aglepristone.

CÁPITULO 1

4 CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS MEDICAMENTOSOS PARA PIOMETRA DURANTE O CURSO TERAPÊUTICO (ANÁLISE TEMPORAL) EM CADELAS

Foram objetivos deste experimento comparar:

1. Os efeitos clínicos ao curso de distintos protocolos de tratamento medicamentoso para piometra em cadelas;
2. A resposta medular ao curso de distintos protocolos de tratamento medicamentoso para piometra em cadelas;
3. A hemodinâmica e vascularização uterina após distintos protocolos de tratamento medicamentoso para piometra em cadelas.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob protocolo nº 5997311017.

4.1.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizadas 10 cadelas, de peso e raças variadas, com idade superior a 4 anos e diagnóstico de HEC-Piometra. O diagnóstico presuntivo foi realizado por meio da biometria uterina por ultrassonografia em modo B e Doppler no modo colorido e pulsátil, em associação ao quadro clínico característico da afecção. Como critérios de exclusão, foram considerados condições sistêmicas adversas (insuficiência renal aguda, insuficiência hepática, sinais clínicos de sepse e alterações ultrassonográficas sugestíveis de peritonite), além da piometra de colo uterino fechado.

Após o diagnóstico, as cadelas foram alocadas, de forma aleatória, em 2 grupos experimentais (Tabela 1):

- Grupo tratamento **Aglepristone (RU46534):** constituído de fêmeas (n=5) para as quais foi instituído tratamento medicamentoso com aglepristone (Alizin® -

30 mg / 100 mL - VIRBAC, Carros, França) na dose de 10 mg/Kg, SID, por via sub-cutânea, nos dias 1, 2 e 8 após o diagnóstico (FIENI, 2014; FIENI, 2006).

- Grupo tratamento **Associação:** constituído de fêmeas (n=5) para as quais foi instituído tratamento medicamentoso com aglepristone (Alizin® -30 mg / 100 mL - VIRBAC, Carros, França) na dose de 10 mg/Kg, SID, por via sub-cutânea, nos dias 1, 2 e 8 após o diagnóstico (FIENI, 2014; FIENI, 2006), além da administração de prostaglandina sintética (Ovolute® - 7,5 mg / 100 mL – DRAG PHARMA, Santiago, Chile), na dose de 1 µg/kg (FIENI, 2014; FIENI, 2006), SID, por via intramuscular durante 7 dias.

Tabela 1 - Descrição da raça e idade das fêmeas constituintes dos grupos experimentais.

CADELA	GRUPO	RAÇA	IDADE (Kg)
1	Aglepristone	Daschund	8
2	Aglepristone	Weimaraner	8
3	Aglepristone	Lhasa Apso	9
4	Aglepristone	SRD	7
5	Aglepristone	SRD	8
6	Associação	Boxer	9
7	Associação	SRD	10
8	Associação	SRD	10
9	Associação	SRD	4
10	Associação	Labrador	9

Para as avaliações clínica e laboratorial, além das variáveis experimentais de área, perímetro e escore de vascularização por análise ultrassonográfica, a cadela foi considerada a unidade experimental (n=5 em cada grupo experimental). Por outro lado, para as demais variáveis ultrassonográficas, a unidade experimental foi considerada a artéria uterina (direita e esquerda), subdividindo-se em artéria uterina *mais comprometida* e *menos comprometida* (n=10 em cada grupo experimental). Tal classificação foi realizada a partir do índice de resistividade (RI) da artéria uterina, variável hemodinâmica obtida à primeira avaliação por ultrassonografia Doppler. Desta forma, a artéria para a qual foi atribuído menor valor de RI era considerada *mais comprometida* e, inversamente, a artéria contralateral era classificada como *menos comprometida*.

As cadelas em tratamento permaneceram sob internação e cuidados intensivos, sendo realizada terapia de suporte por antibioticoterapia e fluidoterapia (ANEXO A) durante todo o período experimental.

4.1.2 Análise do poder do teste

A análise do poder do teste foi realizada pelo aplicativo SAS Power and Sample Size (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), utilizando valores de médias e erro padrão de duas variáveis experimentais (índice de resistividade da artéria uterina direita e esquerda) nos dias 1, 2 e 8 do tratamento. As análises mostraram poder do teste acima de 0,80, demonstrando que o número de animais (n=5) assegura o valor científico do presente experimento (Tabela 2).

Tabela 2 - Poder do Teste e respectivas unidades experimentais (n) nos grupos experimentais (Aglepristone e Associação) para as variáveis de índice de resistividade da artéria direita e esquerda.

Grupos	**Índice de resistividade Direita**		**Índice de resistividade Esquerda**	
	n	Poder do teste	n	Poder do teste
Aglepristone	5	0,958	5	0,97
Associação	5	0,958	5	0,97

4.1.3 Avaliação Clínica e Laboratorial

A avaliação clínica foi realizada nos dias 1 e 2 após o diagnóstico, sempre nos seguintes momentos: pré-tratamento, 15 e 60 minutos após aplicação do protocolo terapêutico. Para tal avaliação, foram considerados os parâmetros de frequência cardíaca [FC, batimentos por minuto (bpm)] e respiratória [FR, movimentos por minuto (mpm)], coloração de mucosa, tempo de preenchimento capilar (TPC, segundos), grau de hidratação por turgor cutâneo (%) e aferição da temperatura corpórea (T ºC). Entretanto, somente a FC, FR e T ºC foram consideradas como variáveis experimentais. Ademais, foi observada a ocorrência de qualquer sinal clínico anormal, tais como êmese, diarreia, sialorreia e midríase.

Para avaliar o curso dos protocolos de tratamento, amostras de sangue venoso foram coletadas nos dias 1, 4 e 8 após o início da terapia. O sangue foi colhido por punção da veia jugular e as amostras imediatamente transferidas para tubos com anticoagulante EDTA para realização de hemograma ou tubos com ativador de coágulo para realização de perfil hepático (Fosfatase Alcalina e Alanina Aminotransferase) e renal (Uréia e Creatinina). Os valores de hemácias (He, 10^6/mm³), hematócrito (Ht, %), leucócitos totais (mm³) e proteína plasmática (PT, g/dL)

foram considerados variáveis experimentais, adotando-se os valores de referência descritos no ANEXO B.

4.1.4 Avaliação Ultrassonográfica

O exame de ultrassonografia foi realizado sempre pelo mesmo operador, com o equipamento Mindray® modelo M5Vet, equipado com transdutor microconvexo de 5 MHz. As fêmeas foram posicionadas em decúbito lateral, direito e esquerdo, e a avaliação transcorreu por via transabdominal. As avaliações foram realizadas diariamente durante 8 dias, sempre previamente à administração da terapia.

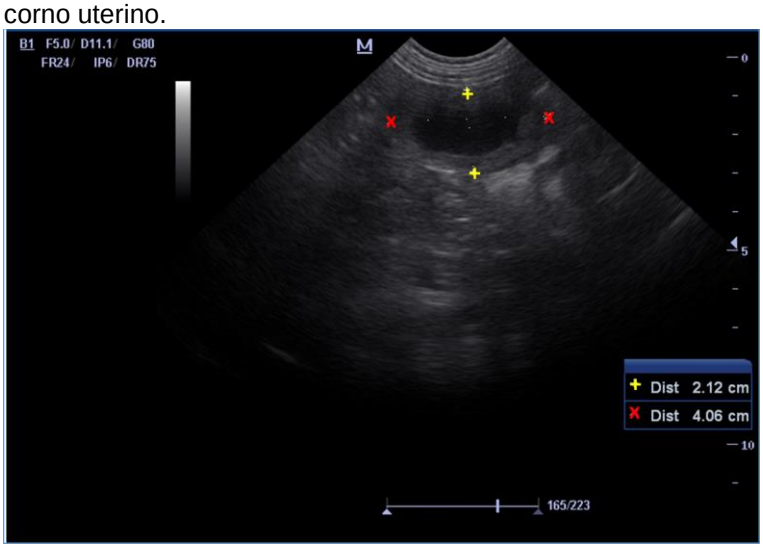
4.1.4.1 Avaliação Ultrassonográfica Bidimensional

Foram realizadas mensurações quanto ao diâmetro e a presença de conteúdo intraluminal uterino (Figura 3). Para tanto, foi calculado a área (fórmula a) e o perímetro (fórmula b) dos cornos uterinos por modo-B convencional em região mesográstrica e hipogástrica, com imagens em escala de cinza (Figura 3).

(a) $\text{Área} = R1 \times R2 \times \pi$

(b) $\text{Perímetro} = 2\pi \times \sqrt{(R1^2 + R2^2)} / 2$

Figura 3 - Avaliação ultrassonográfica bidimensional (5 Mhz) do corno uterino em corte transversal. (+) Mensuração (cm) da altura do corno uterino e (x) mensuração (cm) da largura do corno uterino.



Fonte: Laboratório de Inseminação Artificial, Perinatologia e Patologia da Reprodução (2019).

4.1.4.2 Avaliação Ultrassonográfica por Doppler Colorido

Para a avaliação qualitativa da vascularização endometrial, o escaneamento dos cornos uterinos foi realizado, preferencialmente, em corte transversal no modo-B, seguido do Doppler colorido. Por se tratar de avaliação subjetiva, adotou-se escore de 1 a 3, sendo 1 considerado o grau mínimo e 3 o grau máximo de vascularização (Figura 4), adaptado da classificação proposta por Veiga *et al.* (2017).

Figura 4 – Avaliação ultrassonográfica dos cornos uterinos por Doppler colorido em corte transversal. Escore de vascularização de 1 a 3.

Fonte: Laboratório de Inseminação Artificial, Perinatologia e Patologia da Reprodução (2019).

4.1.4.3 Avaliação Ultrassonográfica por Doppler Espectral

A dinâmica vascular das artérias uterinas, direita e esquerda, foi mensurada após o escaneamento dos vasos pelo modo-B. As mensurações foram realizadas preferencialmente na região lateral do corpo uterino, em corte longitudinal, utilizando-se a vesícula urinária como janela acústica.

O Doppler colorido (colour-flow Doppler, CF) foi inicialmente utilizado para o mapeamento dos vasos e, posteriormente, o Doppler pulsado ou espectral (pulsed-wave Doppler, PW) foi utilizado para caracterizar a forma da onda.

Os seguintes parâmetros de velocidade do fluxo sanguíneo foram determinados: pico de velocidade sistólica (PS), velocidade diastólica final (ED) e velocidade média de um ciclo cardíaco (TAMAX); e os seguintes índices hemodinâmicos: índice de resistividade (RI), índice de pulsatilidade (PI) e relação sístole/diástole (S/D). Tais variáveis foram calculadas automaticamente pelo software do equipamento, utilizando-se as seguintes fórmulas matemáticas ou índice de Pourcelot:

$$RI = \frac{\text{Velocidade do pico sistólico (PS)} - \text{Velocidade ao fim da diástole (ED)}}{\text{Velocidade do pico sistólico (PS)}}$$

$$PI = \frac{\text{Velocidade do pico sistólico (PS)} - \text{Velocidade ao fim da diástole (ED)}}{\text{Velocidade média de um ciclo cardíaco (TAMAX)}}$$

$$\text{Relação sístole / diástole} = \frac{\text{Velocidade do pico da sístole (PS)}}{\text{Velocidade ao fim da diástole (ED)}}$$

O volume da amostra foi posicionado no centro do vaso e o ângulo de insonação foi corrigido, não ultrapassando 60º. O total de 9 ondas estáveis de cada artéria uterina foi obtido para calcular a média de cada variável. A cada 3 ondas, os valores foram anotados e a média calculada. Desta maneira, as 3 médias obtidas, do total de ondas, foram utilizadas para o cálculo da média final para cada variável estudada.

4.1.5 Análise Estatística

Todos os dados foram avaliados utilizando o Sistema SAS para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Pelo aplicativo Guided Data Analisys, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias. Quando não obedeceram a tais premissas, foram transformados de acordo com sugestões do aplicativo (logaritmo na base 10 - Log10X; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X2, Arco seno – arcsin (X); entre outras). Todas as variáveis utilizadas foram paramétricas.

Para a análise clínica, os dados foram avaliados de acordo com um fatorial 2x2 em medidas repetidas no tempo, sendo os fatores: o tratamento (aglepristone vs. associação), o momento de avaliação após aplicação (0, 15 e 60 minutos) e os tempos (1 e 2 dias após o início da terapia). Como não foram observadas interações triplas (Tratamento X Minutos após aplicação X Dia do tratamento), foram consideradas as seguintes interações: Tratamento X Dia do tratamento, Tratamento X Minutos após

aplicação, Dia do tratamento X Minuto após aplicação. Não havendo interações duplas, foi utilizado teste T de Student na comparação entre os tratamentos (independentemente do dia de tratamento e minutos após aplicação) e entre os dias de tratamento (independentemente dos minutos após aplicação e do tratamento) e teste LSD entre os minutos após a aplicação (independentemente do dia de tratamento e do tratamento).

Para as análises laboratoriais, perímetro, área e escore ultrassonográfico, os dados foram avaliados de acordo com uma interação dupla, sendo os fatores: o grupo de tratamento (aglepristone vs. associação) e o tempo (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 dias após o início do tratamento). Quando não foi observada interação, o efeito dos grupos foi analisado ao fundir todos os momentos de avaliação utilizando teste T de Student e, inversamente, os tempos de avaliação foram comparados combinando-se todos os grupos utilizando teste LSD.

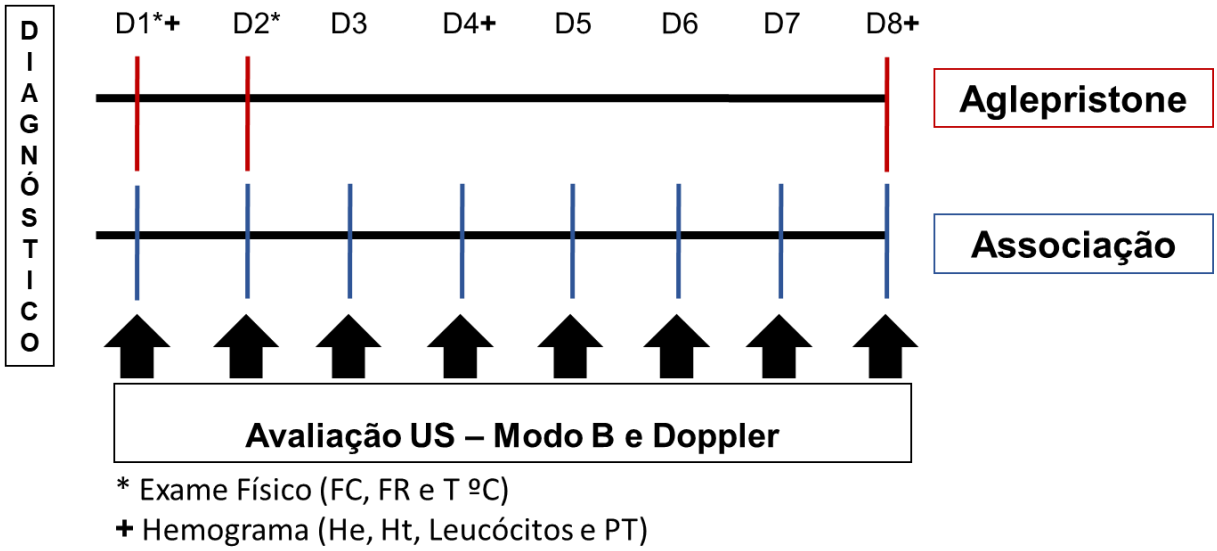
Para a avaliação do Doppler Espectral, os dados foram avaliados de acordo com um fatorial 2x2 em medidas repetidas no tempo, sendo os fatores: o tratamento (aglepristone vs. associação), o grau de acometimento (artéria uterina mais comprometida vs. menos comprometida) e os tempos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8). Como não foram observadas interações triplas (Tratamento X Grau de acometimento X Tempo), foram consideradas as seguintes interações: Tratamento X Grau de acometimento, Tratamento X Tempo, Grau de acometimento X Tempo. Não havendo também interações duplas, foi utilizado teste T de Student na comparação entre os tratamentos (independentemente do tempo e do grau de acometimento) e entre os graus de acometimento (independentemente do tempo e do tratamento) e teste LSD entre os tempos (independentemente do grau de acometimento e do tratamento).

As variáveis respostas foram também submetidas à análise de correlação de Pearson. Os resultados foram descritos como a média e erro padrão. O nível de significância utilizado foi de 5%.

4.1.6 Delineamento Experimental Capítulo 1

A determinação das variáveis seguiu um padrão de repetições ao longo do tempo, em períodos previamente definidos (Figura 5).

Figura 5 - Delineamento experimental adotado para o Capítulo 1.



4.2 RESULTADOS

4.2.1 Interações Estatísticas

Não foram observadas interações triplas entre os momentos de avaliação clínica (0, 15 e 60 minutos após aplicação), dos dias de tratamento (dia 1 e 2 após o diagnóstico) e grupos de tratamento (Aglepristone e Associação) para as variáveis do exame físico (Tabela 3). Entretanto, ocorreu interação significativa entre o grupo de tratamento e o momento de avalição para a variável FR (p =0,04).

Tabela 3 - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Aglepristone VS. Associação), dias de tratamento (1 e 2) e momento de avaliação clínica após aplicação (0, 15 e 60 minutos).

VARIÁVEL	GRUPO	DIA	MINUTO	GRUPO x DIA	GRUPO x MIN	DIA x MIN	GRUPO x DIA x MIN
FC	0,75	0,75	0,19	0,78	0,18	0,18	0,91
FR	**0,04**	0,49	**0,02**	0,6	0,12	**0,04**	0,9
T	0,24	0,06	0,07	0,99	0,67	0,35	0,91

Para a avaliação laboratorial, observou-se interação estatística (Tabela 4) apenas entre o grupo de tratamento (Aglepristone e Associação) e os dias de tratamento (1, 4 e 8 dias após o diagnóstico) para a variável proteína plasmática total (p= 0,03).

Tabela 4 - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Aglepristone VS. Associação) e dias de tratamento (1, 4 e 8 dias após o diagnóstico).

VARIÁVEL	GRUPO	TEMPO	GRUPO x TEMPO
He	0,18	**<,0001**	0,13
Ht	0,13	**<,0001**	0,12
Leucócitos	0,42	0,05	0,7
Pt	0,33	**0,0017**	**0,03**

Foram observadas interações duplas (Tabela 5) entre os grupos de tratamento (Aglepristone e Associação) e dias de tratamento (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 dias após o diagnóstico) para as variáveis área e perímetro uterino na avaliação ultrassonográfica (p= 0,08 e p= 0,08, respectivamente).

Tabela 5 - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Aglepristone VS. Associação) e dias de tratamento (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 dias após o diagnóstico).

VARIÁVEL	TEMPO	GRUPO	TEMPO x GRUPO
Área	0,49	**<,0001**	**0,08**
Perímetro	0,48	**<,0001**	**0,08**
Escore	0,67	**<,0001**	0,98

Não foram observadas interações triplas e duplas entre os grupos de tratamento (Aglepristone e Associação), dias de tratamento (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 após o diagnóstico) e o Grau de acometimento da artéria uterina (mais comprometida e menos comprometida) para as variáveis obtidas por avalição ultrassonográfica em Doppler Espectral (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Aglepristone VS. Associação), dias de tratamento (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 após o diagnóstico) e o Grau de acometimento (mais e menos acometida).

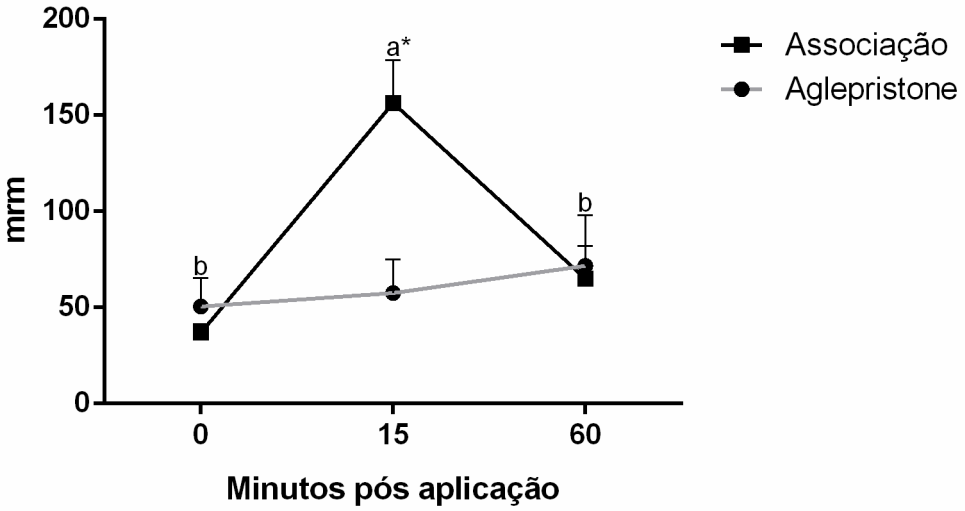
VARIÁVEL	TEMPO	GRUPO	GRAU	TEMPO x GRAU	TEMPO x GRUPO	GRUPO x GRAU	TEMPO x GRUPO x GRAU
OS	0,93	0,78	0,23	0,7	0,32	0,97	0,55
ED	**0,02**	**0,02**	0,46	0,4	0,13	0,47	0,51
TAMAX	0,29	0,07	0,25	0,4	0,17	0,52	0,49
PI	**0,0008**	**0,0003**	0,63	0,43	0,25	0,26	0,85
RI	**0,0004**	**0,0006**	0,71	0,42	0,48	0,43	0,95
SD	**0,0002**	**0,0004**	0,55	0,45	0,29	0,32	0,96

4.2.2 Avaliação Clínica

Foi observado aumento significativo da frequência respiratória nas cadelas do grupo Associação entre os momentos 0 e 15 minutos após aplicação do protocolo

de tratamento (36,89 ±4,31 e 156,44 ±22,29 mpm, respectivamente), seguida de queda entre 15 e 60 minutos após a aplicação. Ademais, foi observada maior frequência respiratória no grupo Associação (156,44 ±22,29 mpm) em comparação ao grupo Aglepristone (57,50 ±17,56 mpm) 15 minutos após a aplicação (Figura 6).

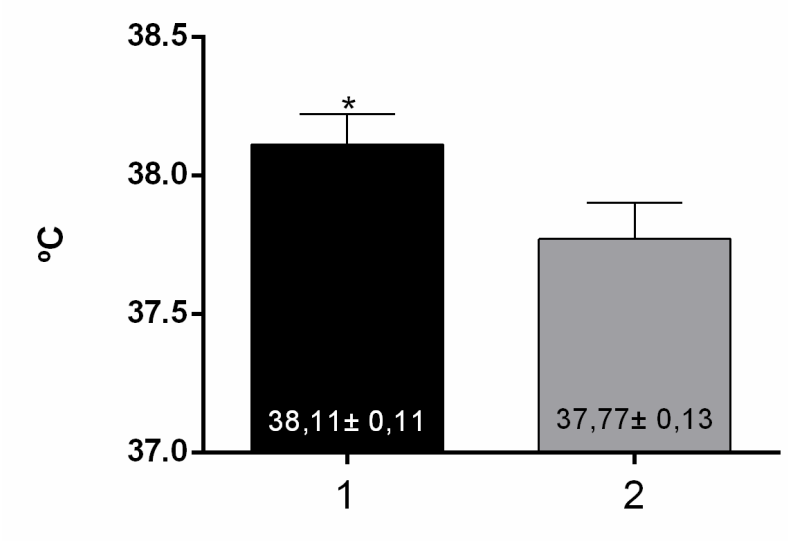
Figura 6 – Média e erro padrão da frequência respiratória (mpm) nos grupos Aglepristone e Associação após aplicação do protocolo de tratamento.



*indica diferença significativa entre grupos (p<0,05). a-b indica diferença significativa entre tempos no grupo Associação (p<0,05).

Houve diminuição significativa da temperatura corpórea nas cadelas do grupo Associação entre o 1º e 2º dia de tratamento (Figura 7).

Figura 7 – Média e erro padrão da temperatura corpórea (ºC) das cadelas do grupo Associação ao 1º e 2º dias de tratamento.



*indica diferença significativa entre dias de tratamento (p<0,05).

Em referência às alterações clínicas após a administração dos protocolos terapêuticos, optou-se por realizar avaliação descritiva (Quadro 2). No grupo Aglepristone, não foram observadas alterações clínicas ao longo do tratamento. Porém, no grupo Associação observou-se efeitos adversos principalmente aos 15 e 60 minutos após aplicação do protocolo terapêutico, sendo sialorreia o efeito mais comumente relatado (Quadro 2).

Quadro 2 - Número de ocorrência de sinais clínicos adversos nos momentos 15 e 60 minutos após a administração do protocolo de tratamento no Grupo Associação.

	Dias de Tratamento													
	1		2		3		4		5		6		7	
Alterações Clínicas	15	60	15	60	15	60	15	60	15	60	15	60	15	60
sialorreia	1	0	4	0	4	2	4	2	4	2	3	2	3	0
êmese	4	1	4	0	2	2	2	3	2	0	2	0	2	3
diarreia	1	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
mídriase	3	0	2	0	4	2	3	2	3	3	4	3	3	2
miose	1	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento (Tabela 7) e momentos de avaliação após a aplicação do protocolo terapêutico (Tabela 8) para as variáveis de frequência cardíaca e temperatura corpórea. Ademais, não foi possível observar diferença estatística entre os dias 1 e 2 após o diagnóstico e instituição do tratamento para a variável de frequência cardíaca (Tabela 9).

Tabela 7 – Média e erro padrão da frequência cardíaca (bpm) e temperatura corpórea (ºC) nos distintos grupos experimentais.

VARIÁVEL	AGLEPRISTONE	ASSOCIAÇÃO	P
FC	122,20 ±4,11	124,37 ±5,00	0,73
T	38,04 ±0,12	37,81 ±0,13	0,2

Tabela 8 - Média e erro padrão da frequência cardíaca (bpm) e temperatura corpórea (ºC) até 60 minutos após a aplicação do protocolo terapêutico.

VARIÁVEL	0	15	60	P
FC	115,89 ±5,44	130,11 ±5,73	123,78 ±5,12	0,18
T	38,17 ±0,13	37,94 ±0,13	37,67 ±0,19	0,07

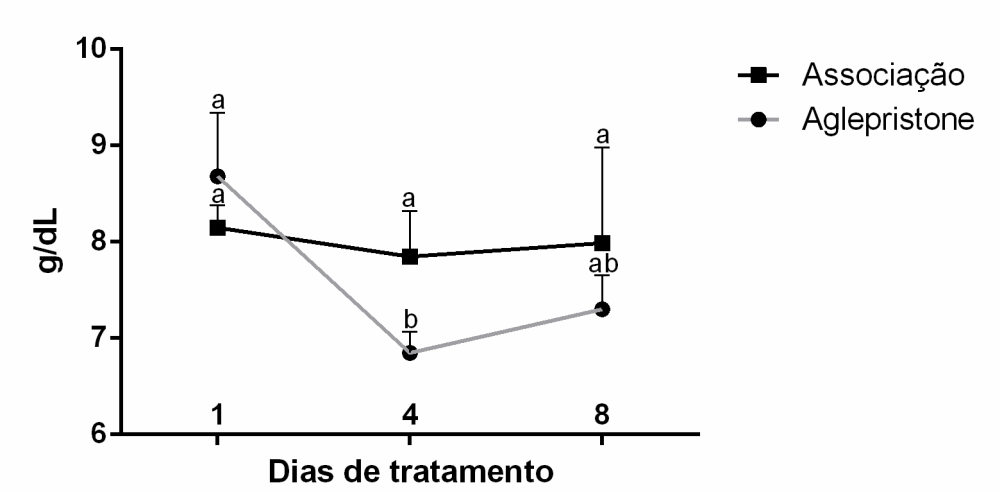
Tabela 9 - Média e erro padrão da frequência cardíaca (bpm) ao 1º e 2º dia após o diagnóstico e instituição do protocolo terapêutico.

VARIÁVEL	1	2	P
FC	124,37 ±4,87	122,21 ±4,24	0,73

4.2.3 Avaliação Laboratorial

Na avaliação laboratorial, foi observada diminuição significativa da concentração de proteína plasmática total no Grupo Aglepristone do 1º dia (8,68 ±0,66 g/dL) ao 4º dia após a instituição da terapia (6,85 ±0,22 g/dL) (Figura 8).

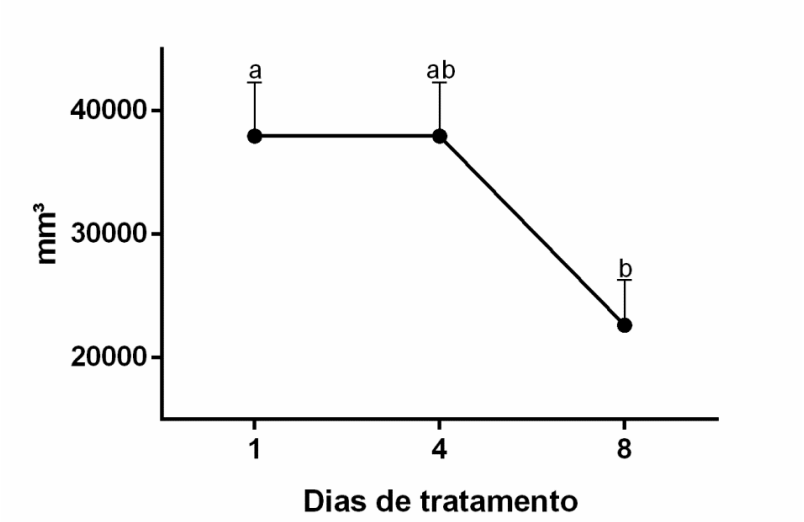
Figura 8 – Média e erro padrão da concentração de proteína plasmática total (g/dL) nos grupos Aglepristone e Associação durante o período experimental.



a-b indica diferença significativa entre momentos de avaliação no mesmo grupo ($p<0,05$).

Ao longo do curso de tratamento (8 dias), foi verificado declínio progressivo na contagem de leucócitos totais, com diferença significativa entre o 1º (37.963 ±4.325,29 mm^3) e 8º dia (22.640 ±3.638,79 mm^3) após a instituição da terapia (Figura 9). Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais (Tabela 10).

Figura 9 – Média e erro padrão da contagem de leucócitos (mm3) durante o período experimental.



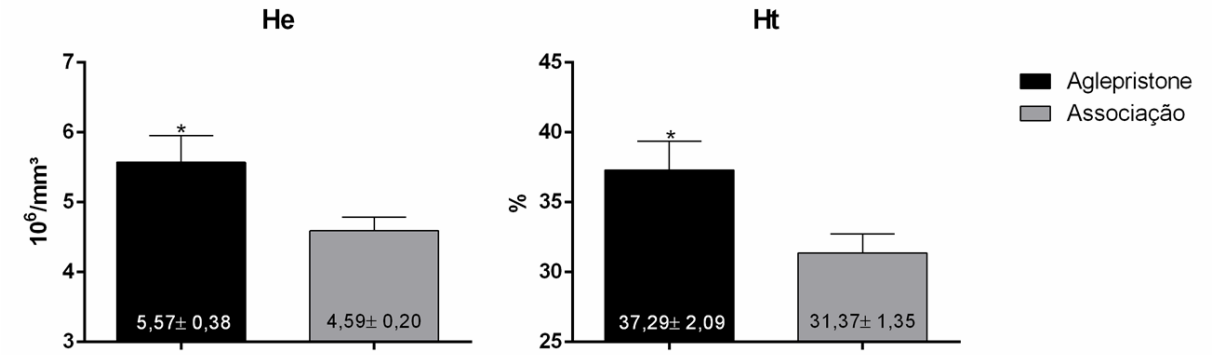
a-b indica diferença significativa entre tempos (p<0,05).

Tabela 10 - Média e erro padrão da contagem de leucócitos (mm3) nos distintos grupos experimentais.

VARIÁVEL	AGLEPRISTONE	ASSOCIAÇÃO	P
Leucócitos	28618,67 ±3876,94	33607,14 ±3206,02	0,33

As cadelas do grupo Associação apresentaram menor contagem de hemácias e hematócrito, em comparação ao grupo Aglepristone (Figura 10), porém, não houve diferença estatística entre os momentos de avaliação (Tabela 11).

Figura 10 – Média e erro padrão para a contagem de hemácias (He, 106/mm3) e hematócrito (Ht, %) nos distintos grupos experimentais.



*indica diferença significativa entre os grupos experimentais (p<0,05).

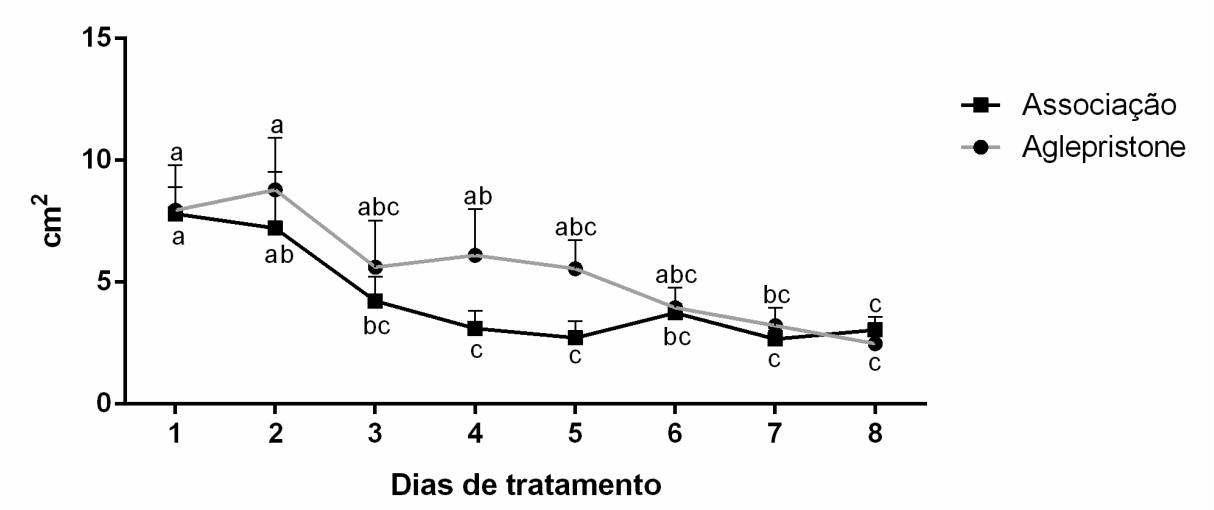
Tabela 11 - Média e erro padrão para a contagem de hemácias (He, 106/mm3) e hematócrito (Ht, %) ao longo do tratamento.

VARIÁVEL	1	4	8	P
He	5,75 ±0,45	4,69 ±0,32	4,81 ±0,39	0,11
Ht	38,85 ±2,46	32,09 ±1,82	32,11 ±2,23	0,06

4.2.4 Avaliação Ultrassonográfica

A área e perímetro dos cornos uterinos diminuíram progressivamente ao longo do período experimental (Figuras 11 e 12), embora sem diferença estatística entre os grupos experimentais. Para a área uterina, observou-se diferença estatística entre o 1º dia (7,81 ±1,1 cm^2) e 7º - 8º dias (2,67 ±0,33 e 3,05 ±0,53 cm^2, respectivamente) após a instituição do tratamento com Aglepristone (Figura 11). No entanto, para o grupo Associação, houve diminuição significativa da área uterina já no 3º dia (4,23 ±0,99 cm^2) após o início do tratamento (Figura 11).

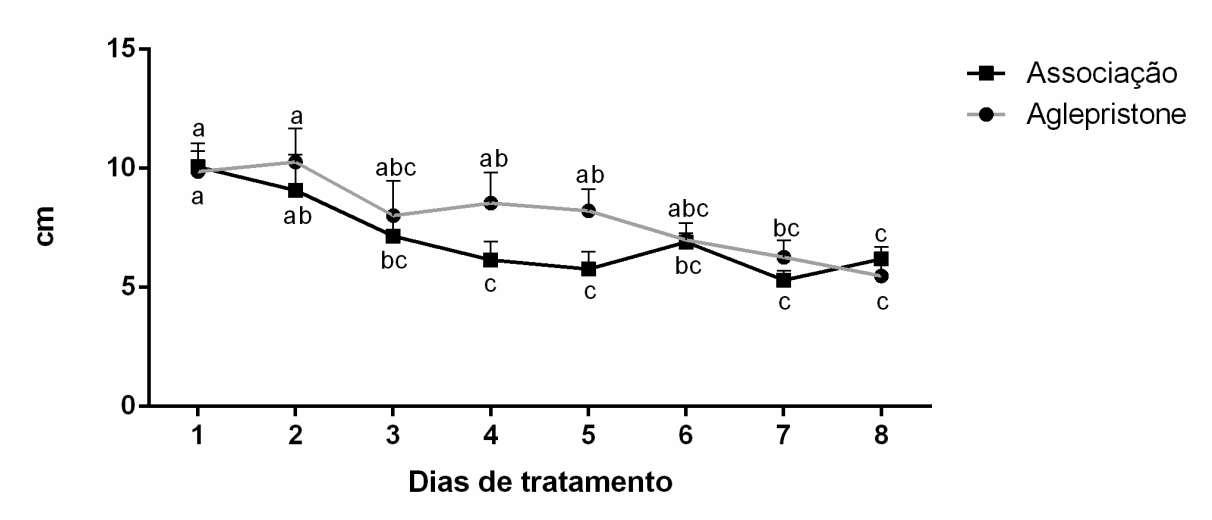
Figura 11 – Média e erro padrão da área (cm^2) dos cornos uterinos nos distintos grupos experimentais ao longo do período de tratamento.



a-c indica diferença significativa entre os momentos de avaliação ($p<0,05$).

Para o perímetro dos cornos uterinos, observou-se diferença estatística entre o 1º dia (10,07 ±0,66 cm) e 3º dia (7,15 ±0,84 cm) após o início da terapia no grupo Associação (Figura 12), mantendo-se tal perfil até o final do tratamento. Para o grupo Aglepristone, houve declínio progressivo do perímetro uterino, com diferença estatística apenas entre o 1º dia (9,87 ±1,17 cm) e 7º - 8º dias (6,27 ±0,70 e 5,48 ±0,57 cm, respectivamente) após o início do tratamento (Figura 12).

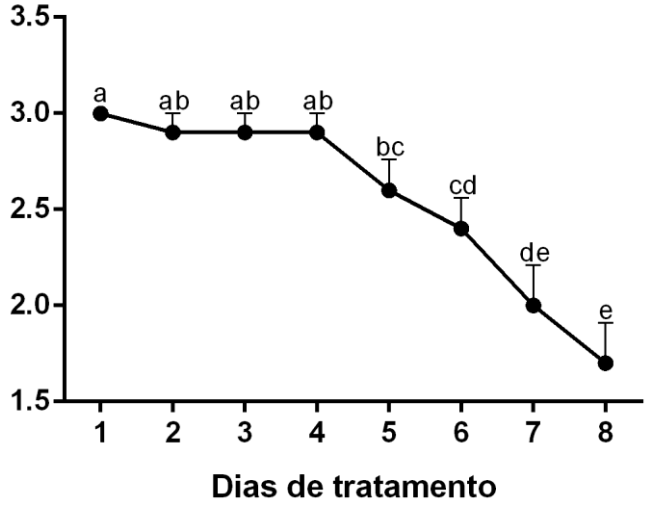
Figura 12 - Média e erro padrão do perímetro (cm) dos cornos uterinos nos distintos grupos experimentais ao longo do período de tratamento.



a-c indica diferença significativa entre os momentos de avaliação (p<0,05).

Em relação ao escore de vascularização uterino, houve diminuição ao curso do tratamento, evidenciando-se diferença estatística principalmente entre o 1º dia e 5º - 8º dias após o início da terapia (Figura 13).

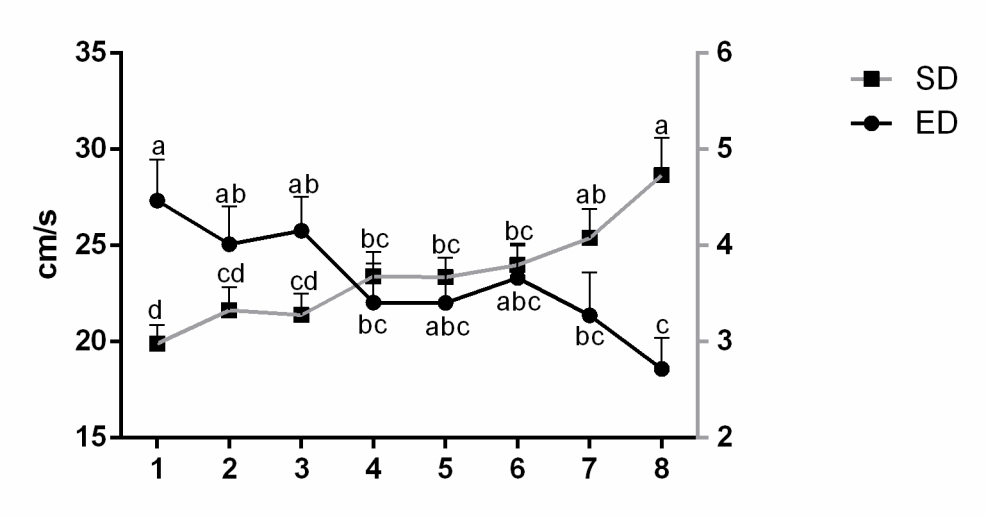
Figura 13 – Média e erro padrão do escore de vascularização (0-3) ao longo do período experimental.



a-e indica diferença significativa entre momentos de avaliação (p<0,05).

Ao longo dos momentos de avaliação terapêutica, foi possível verificar redução da velocidade diastólica final (ED) da artéria uterina, com diferença estatística entre o 1º dia e 4º, 7º e 8º dias do tratamento (Figura 14) Para a relação sístole:diástole (S/D), houve aumento progressivo ao curso do tempo, porém com diferença estatística já entre o 1º e 4º dia após o início do tratamento (Figura 14).

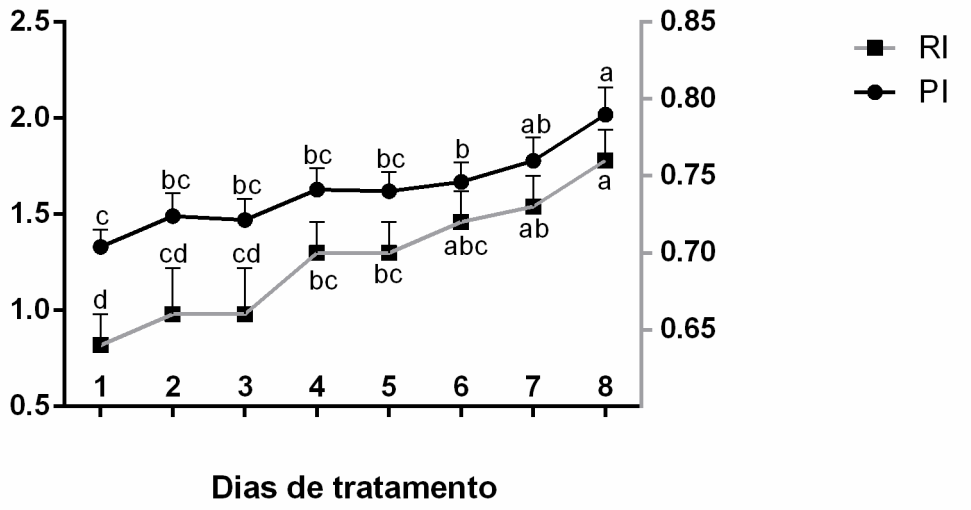
Figura 14 – Média e erro padrão da velocidade diastólica final (ED; cm/s) e relação sístole:diástole (SD; cm/s) ao longo do período experimental.



a-d indica diferença significativa entre os momentos de avaliação (p<0,05).

Foi possível observar aumento dos índices de pulsatilidade (PI) e resistividade (RI) da artéria uterina ao longo do período experimental (Figura 15). No entanto, para o RI, já foi possível notar diferença estatística entre o 1º e 4º - 8º dia após o início do tratamento, enquanto para o PI, houve diferença estatística entre o 1º e 6º - 8º dias de terapia (Figura 15). Para as variáveis PS e Tamax, não foram observadas diferenças estatísticas ao longo do período experimental.

Figura 15 – Média e erro padrão do índice de pulsatilidade e resistividade ao longo do período experimental.

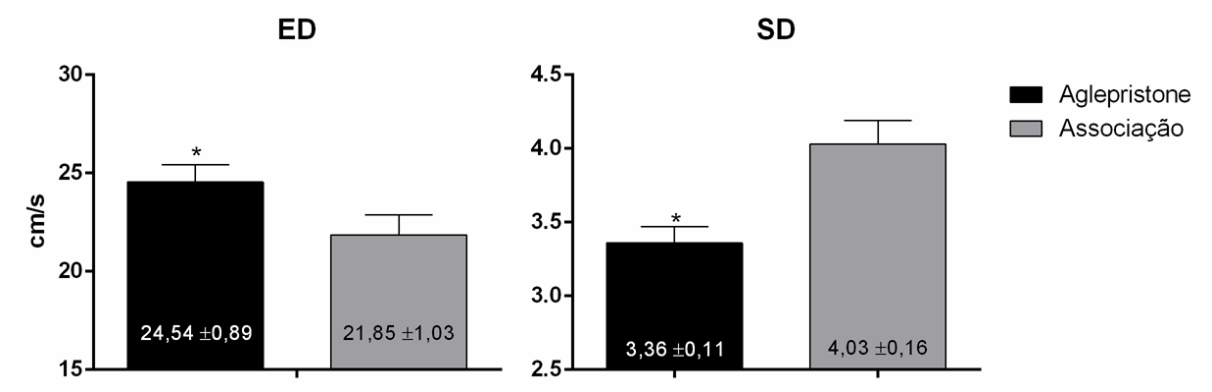


a-d indica diferença significativa entre tempos (p<0,05).

Considerando-se a comparação entre os grupos experimentais, observou-se menor velocidade diastólica final (ED) no grupo Associação e menor relação

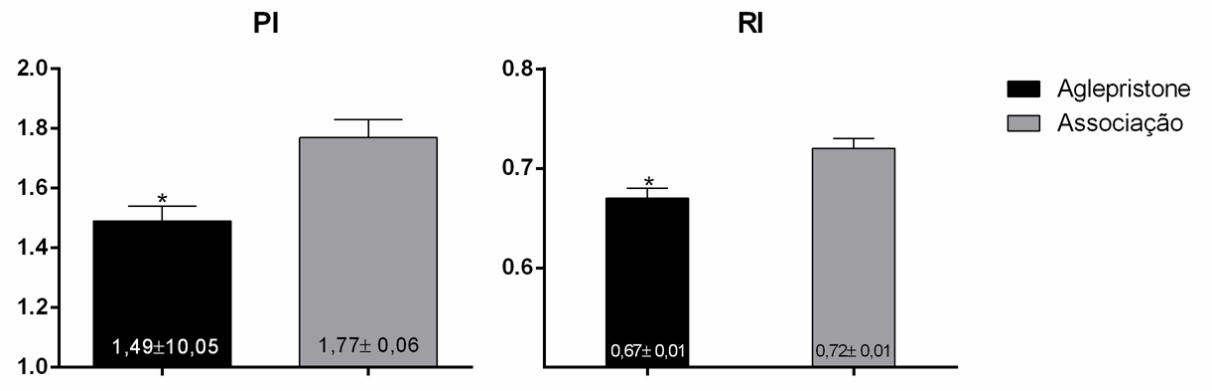
sístole:diástole (SD) no grupo Aglepristone (Figura 16). Inversamente, as variáveis PI e RI foram superiores no grupo Associação em comparação ao grupo Aglepristone (Figura 17). Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais para as variáveis PS, Tamax e escore de vascularização; bem como para o grau de acometimento da artéria uterina para nenhuma das variáveis de avaliação por Doppler Espectral.

Figura 16 – Média e erro padrão da velocidade diastólica final (ED) e relação sístole:diástole (SD) nos distintos grupos experimentais.



*indica diferença significativa entre grupos experimentais (p<0,05).

Figura 17 - Média e erro padrão do índice de pulsatilidade e resistividade nos distintos grupos experimentais.



*indica diferença significativa entre grupos experimentais (p<0,05).

4.2.5 Análise de Correlação

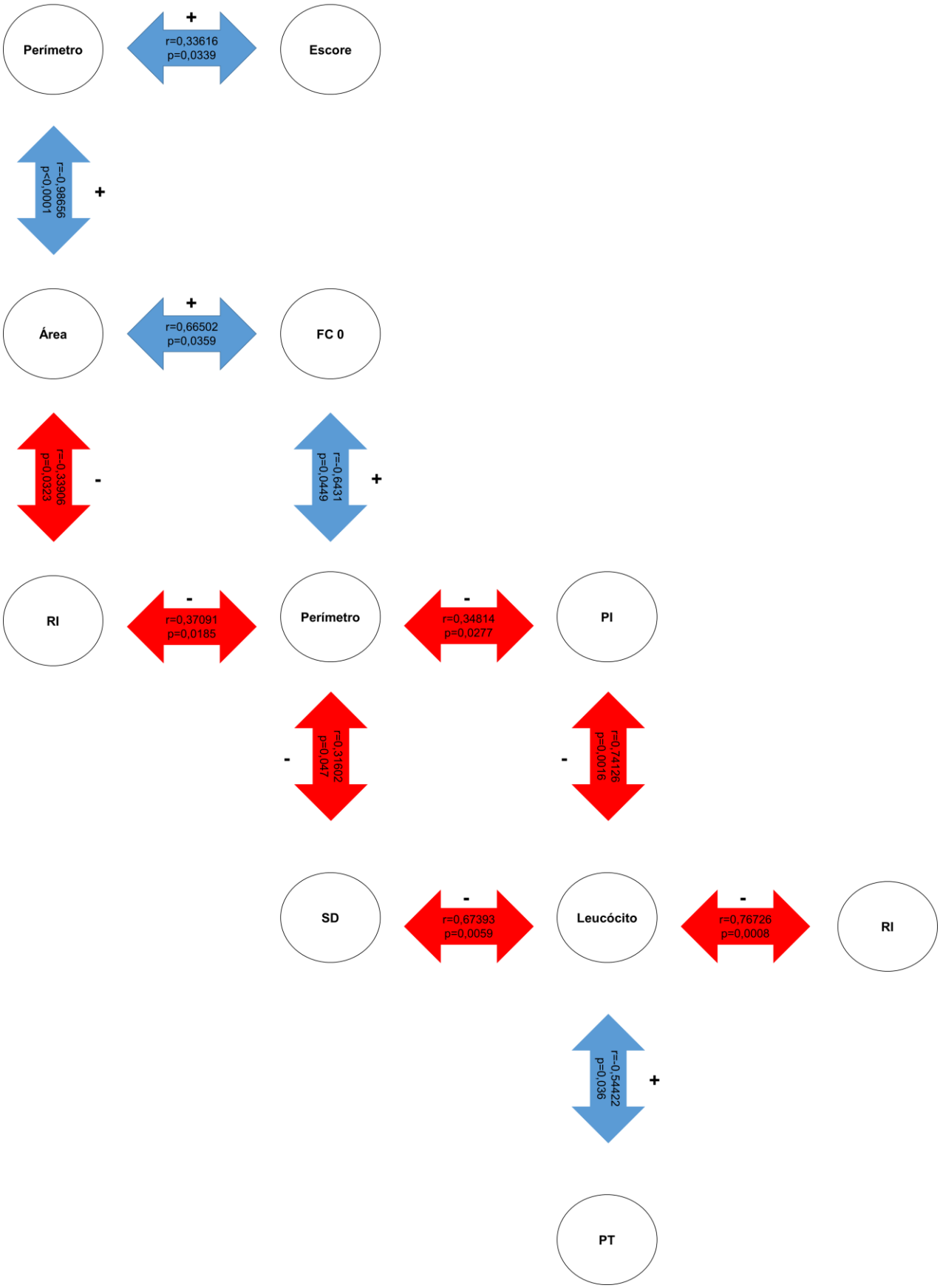
A análise de correlação entre as variáveis-respostas foi realizada considerando-se apenas o efeito do tratamento (Apêndices A e B).

Para o grupo Aglepristone, a área uterina correlacionou-se positivamente com o perímetro uterino (r=0,99; p<0,0001) e frequência cardíaca no tempo 0 (r=0,66; p=0,03), além da correlação negativa com RI (r=-0,33; p=0,03). O perímetro

correlacionou-se positivamente com escore de vascularização (r=0,33; p=0,03) e frequência cardíaca no tempo 0 (r=0,64; p=0,04), e negativamente com SD (r=-0,31; p=0,04), RI (r=-0,37; p=0,01) e PI (r=-0,34; p=0,02). Houve correlação positiva entre a variável Leucócitos e Proteína Total (r=0,54; p=0,03) e negativamente com PI (r=-0,74; p=0,001) e RI (r=-0,76; p=0,0008) (Figura 18).

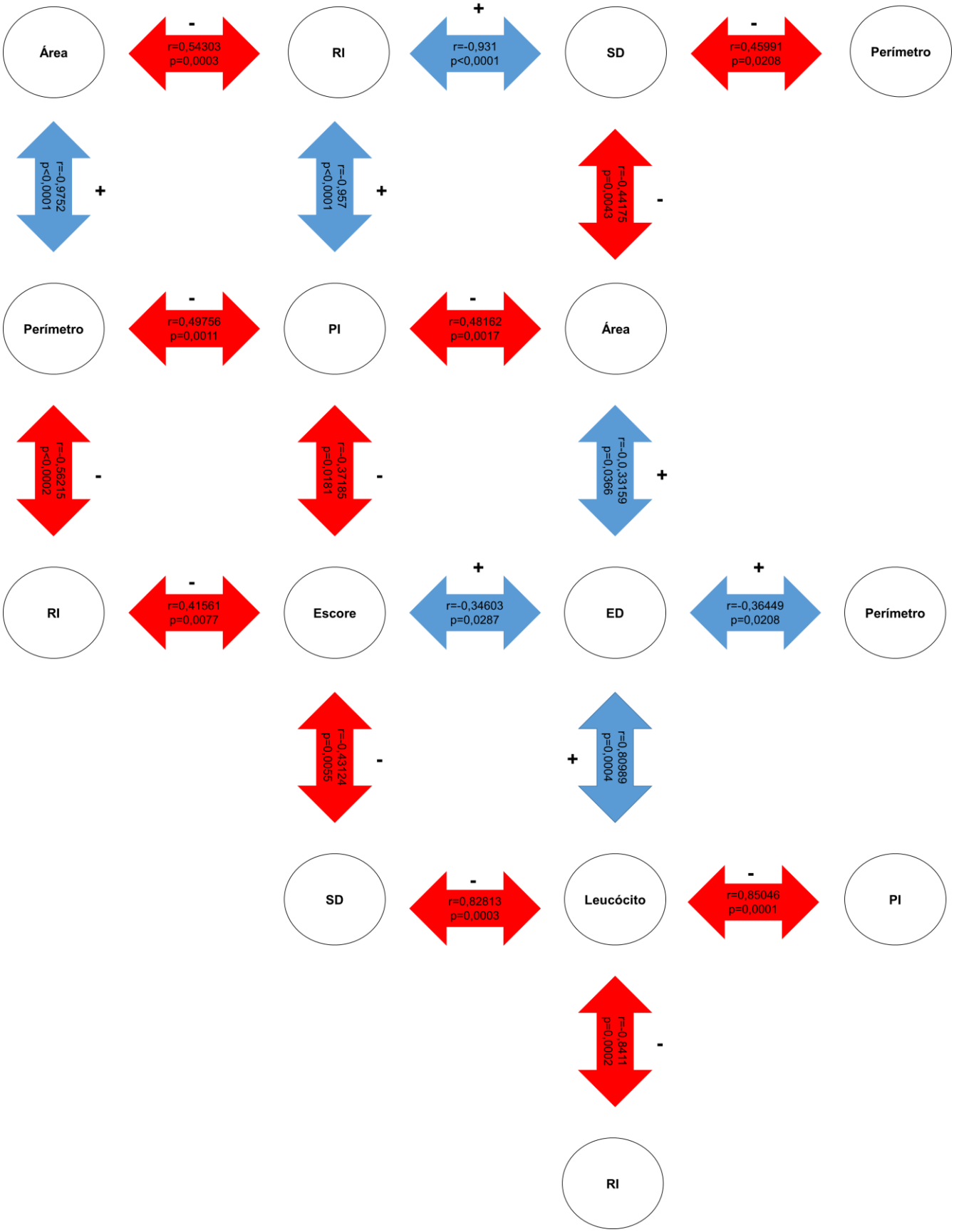
Para o grupo Associação, a área uterina correlacionou-se positivamente com o perímetro uterino (r=0,97; p<0,0001) e ED (r=0,33; p=0,03) e correlacionou-se negativamente com PI (r=-0,48; p=0,001), RI (r=-0,54; p=0,0003) e SD (r=-0,45; p=0,002). O perímetro uterino correlacionou-se positivamente com ED (r=0,36; p=0,02) e negativamente com SD (r=-0,45; p=0,002), RI (r=-0,56; p=0,0002) e PI (r=-0,49; p=0,001). Houve correlação positiva entre o escore de vascularização e ED (r=0,34; p=0,02), e negativamente com a variável SD (r=-0,43; p=0,005), PI (r=-0,37; p=0,01) e RI (r=-0,41; p=0,007). O valor de leucócitos correlacionou-se positivamente com ED (r= 0,80; p=0,0004) e negativamente com PI (r=-0,85; p=0,0001), RI (r=-0,84; p=0,0002) e SD (r=-0,82; p=0,0003) (Figura 19).

Figura 18 – Correlações entre variáveis experimentais para o Grupo Aglepristone.



Setas azuis indicam correlação positiva e setas vermelhas indicam correlação negativa.

Figura 19 – Correlações entre variáveis experimentais para o Grupo Associação.



Setas azuis indicam correlação positiva e setas vermelhas indicam correlação negativa.

4.3 DISCUSSÃO

Até o momento, não há trabalhos em literatura com o principal escopo de comparar distintos tratamentos medicamentosos para piometra, tanto de forma temporal ao curso da terapia, como considerando o efeito de fármacos isolados ou conjugados. Portanto, os achados relativos à modulação do fluxo sanguíneo e hemodinâmica da artéria uterina podem ser considerados inéditos.

Ao longo dos protocolos de tratamento, observamos alterações clínicas adversas ao uso associativo entre aglepristone e PGF2-α semelhante àquelas descritas por outros pesquisadores, tais como taquipneia (FIENI, 2006). No entanto, apenas o grupo Associação apresentou aumento significativo da frequência respiratória após 15 minutos da aplicação dos fármacos, possivelmente por ação constritora da PGF2-α sobre a musculatura lisa pulmonar (WASSERMAN, 1975a; QUAN, MOON e LEMEN, 1982). Porém, tal alteração não perdurou após 60 minutos da aplicação. De fato, Wasserman (1975b) demonstrou que a ação da PGF2- α sobre a via respiratória inicia-se 1 minuto após a aplicação intravenosa, persistindo por 10 minutos. A via de aplicação intramuscular utilizada no presente experimento contribuiu para a manifestação tardia do efeito broncoconstritor, em comparação à via intravenosa.

Após a instituição do tratamento, a temperatura corpórea das cadelas permaneceu dentro da faixa de referência para a espécie (37,5-39,2 ºC; Feitosa, 2014), embora a hipotermia tenha sido relatada após a aplicação da PGF2α (FIENI, TOPIE e GOGNY, 2014). Vale ressaltar, porém, que a progesterona sérica (P4) possui ação termogênica, havendo decréscimo na temperatura corpórea de cadelas em diestro quando ocorre queda na concentração de P4 (CONCANNON e HANSEL, 1977). De fato, no presente experimento houve queda significativa da temperatura corpórea entre o 1º e 2º dias de tratamento, independentemente do protocolo instituído, semelhante ao observado por Corrada *et al*. (2005) em cadelas gestantes submetidas à tratamento abortivo com aglepristone. Por ser uma substância agonista competitiva ao receptor de progesterona, tal medicamento atua diminuindo os efeitos da progesterona circulante (JURKA *et al*., 2013), anulando sua ação termogênica.

Dentre os principais efeitos adversos dos protocolos terapêuticos, destaca-se a sialorreia, êmese e diarreia, os quais decorrem da ação da PGF2α na musculatura lisa (FIENI, 2006). Diferentemente do relato de Jena *et al*. (2013), a

sialorreia foi a principal alteração clínica observada em nosso estudo. Cabe salientar, ademais, que a ocorrência dos sinais adversos diminuiu ao longo do curso terapêutico, sugerindo progressiva tolerância clínica à PGF2α, minimizando os efeitos contralaterais.

Outrossim, resultados interessantes foram observados para a avaliação laboratorial após o início da terapia. Para a concentração de proteína plasmática total, os resultados estiveram acima dos valores de referência, denotando hiperproteinemia. Geralmente de origem inflamatória (STOCKHAM e SCOTT, 2011), o aumento de proteínas circulantes pode estar associado ao desafio da inflamação uterina na piometra (PRASAD, KUMAR e SREENU, 2017), bem como ao efeito das aplicações diárias de PGF2α, a qual promove estímulo à cascata inflamatória aguda (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Por outro lado, no grupo Aglepristone, observou-se diminuição da concentração de proteína plasmática ao 4º dia de tratamento, permanecendo dentro dos valores de referência. Tal resultado demonstra melhora no curso do processo inflamatório após o início da terapia utilizando aglepristone.

No presente experimento, observou-se queda significativa da contagem de leucócitos totais entre o 1º e 8º dia de tratamento, independente do protocolo instituído. Por outro lado, Contri *et al*. (2015) não evidenciaram tal diferença entre o 1º e 7º dia de tratamento para a piometra em cadelas, em função, possivelmente, de diferentes protocolos de antibioticoterapia adotados pelos referidos autores (Amoxicilina e Clavulanato). Contudo, Gobello *et al*. (2003), Gürbulak *et al*. (2005) e Fieni (2006) apresentaram resultados semelhantes aos encontrados em nosso experimento para a contagem total de leucócitos. Diante de tais dados, acreditamos que a adequada escolha antibiótica seja de suma importância para a resposta terapêutica em curso e contribui, sobremaneira, para o sucesso do tratamento.

Estudos anteriores relativos à terapia para a piometra não relatam mudanças nas variáveis do eritrograma (GOBELLO *et al*., 2003; FIENI, 2006), contrariamente aos achados do presente experimento. No grupo Aglepristone, observou-se contagem de hemácias e hematócrito dentro da faixa de referência, porém superiores aos resultados do grupo Associação. As cadelas submetidas ao protocolo associativo apresentaram anemia, independente do dia de avaliação, sugerindo haver menor eritropoiese. Acreditamos que o estímulo à cascata inflamatória promovido pelas aplicações diárias de PGF2α (RICCIOTTI e

FITZGERALD, 2011) e corroborado pelos achados de hiperproteinemia (STOCKHAM e SCOTT, 2011) tenha sido a causa para a anemia arregenerativa.

Durante o curso de tratamento, foi possível observar a eliminação do conteúdo uterino em ambos os protocolos de tratamento, acarretando em diminuição global do diâmetro uterino (perímetro e área). Tais achado vão ao encontro de estudos anteriores (GOBELLO *et al*., 2003; CORRADA *et al*., 2006; ENGLAND, FREEMAN e RUSSO, 2007; DOMOSLAWSKA, JANOWSKI e JURCZAK, 2010; JURKA *et al*., 2010; CONTRI *et al*., 2015). Por outro lado, Fieni (2006) observou redução significativa do volume uterino apenas ao 8º dia após o início do tratamento, tanto quando utilizado a terapia associativa de aglepristone e PF2-α e terapia baseada no uso do aglepristone. Ainda, vale ressaltar que, no presente experimento, a diminuição significativa do perímetro e área uterinos ocorreu de forma mais precoce no grupo Associação, ao 3º dia de tratamento, enquanto no grupo Aglepristone, somente ao 7º dia. Tal resultado pode ser atribuído à ação de contratilidade uterina adicional da PGF2α ao aglepristone no protocolo associativo. Ademais, no grupo aglepristone, houve correlação positiva entre o perímetro e área uterina com a frequência cardíaca, indicando possível ineficiência para a eliminação de endotoxinas bacterianas e, consequentemente, alteração nas funções vitais.

Na latência da piometra, há aumento de vascularização uterina, em comparação ao diestro fisiológico (VEIGA *et al*., 2017). Por outro lado, no presente estudo, observou-se diminuição da vascularização uterina ao longo do curso de tratamento, representando possível resposta favorável aos protocolos medicamentosos, tanto para a piometra, como de suporte. Todavia, mesmo havendo diminuição progressiva do escore de vascularização até o 8º dia de tratamento, tais resultados não atingiram total restabelecimento para valores identificados durante o diestro. Portanto, acreditamos que a alteração da vascularização uterina durante o processo inflamatório seja de recuperação lenta, necessitando avaliação *a posteriori* para comprovação do sucesso terapêutico.

Estudos anteriores demonstram haver alteração importante da hemodinâmica uterina durante a piometra, resultando em aumento do fluxo sanguíneo e diminuição da resistência vascular da artéria uterina (BATISTA *et al*., 2016; VEIGA *et al*., 2017). De fato, as cadelas do presente estudo, ao início do tratamento, apresentavam alto fluxo sanguíneo, semelhante ao descrito por Batista *et al*. (2016) e Veiga *et al*. (2017). Porém, observamos diminuição da velocidade diastólica final (ED)

da artéria uterina, e contrariamente da relação sístole:diástole (S/D), ao curso da terapia. Além disto, foi possível observar correlação negativa entre a contagem total de leucócitos com as variáveis hemodinâmicas PI, RI e SD e correlação positiva com a variável velocidade diastólica final (ED). Tais resultados indicam a influência dos protocolos de tratamento sobre o fluxo sanguíneo uterino, consequentemente, expressando efeito benéfico da terapia medicamentosa, em especial para controle do processo infeccioso. Vale ressaltar que a progesterona possui ação vasodilatadora (MOLINARI *et al*., 2001), por modular a produção de óxido nítrico, consequentemente, diminuindo a concentração de Ca^{2+} nas células lisas musculares dos vasos sanguíneos (MALIQUEO, ECHIBURÚ e CRISOSTO, 2016). Em função da administração terapêutica do Aglepristone, houve redução da ação vasodilatadora da P4 e, em associação à terapia de suporte e redução do processo inflamatório, foi possível observar redução do fluxo sanguíneo na artéria uterina. De fato, durante a terapia medicamentosa, observamos, ademais, aumento progressivo dos índices de resistividade e pulsatilidade da artéria uterina, denotando aumento contínuo da resistência vascular. De acordo com estudos anteriores, na piometra, há diminuição significativa da resistência vascular uterina (BATISTA *et al*., 2016; VEIGA *et al*., 2017), portanto, os resultados obtidos neste experimento sugerem efeito positivo e eficaz dos protocolos terapêuticos na hemodinâmica uterina e fluxo sanguíneo na artéria uterina.

Comparando-se os protocolos de tratamento instituídos neste experimento, o grupo Associação apresentou menor velocidade diastólica final (ED) e, contrariamente, maior relação sístole:diástole (S/D), índice de resistividade e pulsatilidade da artéria uterina, em comparação ao Grupo Aglepristone. Desta forma, podemos inferir que terapia associativa entre Aglepristone e PGF2α promove maior efeito sobre o fluxo sanguíneo do útero, acompanhado de significativa mudança na resistência vascular da artéria uterina. Tais resultados podem ser atribuídos à ação vasoconstritora da PGF2α (NAKANO e COLE, 1969), a qual promove hipertensão moderada (NOVY, PIASECKI e JACKSON, 1974), aumento da resistência periférica total (GERBER e NIES, 1978) e diminuição do fluxo sanguíneo (FLETCHER *et al*., 1976). Ademais, podemos inferir que o tratamento medicamentoso associativo promova redução do processo inflamatório responsável pela alteração hemodinâmica (vasodilatação) da artéria uterina.

No presente estudo, não foram observadas diferenças hemodinâmicas ao longo do curso terapêutico entre a artéria uterina mais e menos comprometida. Desta

maneira, podemos sugerir que o acompanhamento ultrasonográfico para avaliação da eficácia do tratamento medicamentoso possa ser efetuado independentemente da artéria uterina localizada pelo examinar, facilitando a abordagem diagnóstica.

CAPÍTULO 2

5 CAPÍTULO 2 – EFEITO DOS TRATAMENTOS MEDICAMENTOSOS PARA PIOMETRA SOBRE A MORFOLOGIA E HEMODINÂMICA UTERINA EM CADELAS

Foram objetivos deste capítulo comparar:

1. A hemodinâmica e vascularização uterina em cadelas com piometra submetidas a distintos protocolos de tratamento medicamentoso.
2. Características morfométricas uterinas em cadelas com piometra submetidas a distintos protocolos de tratamento medicamentoso.
3. Efeitos na angiogênese uterina em cadelas com piometra submetidas a distintos protocolos de tratamento medicamentoso.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme descrito anteriormente para o Capítulo 1.

5.1.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizadas 17 cadelas, de peso e raças variadas, com idade superior a 4 anos e com diagnóstico de HEC-Piometra. O diagnóstico presuntivo e critérios de exclusão obedeceram às mesmas características descritas anteriormente para o Capítulo 1.

Após o diagnóstico, as cadelas foram alocadas, de forma aleatória, em 3 grupos experimentais (Tabela 12):

- Grupo **Controle piometra:** constituído de fêmeas (n=7) submetidas à imediata ovariohisterectomia.

- Grupo tratamento **Aglepristone (RU46534):** constituído de fêmeas (n=5) para as quais foi instituído tratamento medicamentoso com aglepristone (Alizin® - 30 mg / 100 mL - VIRBAC, Carros, França) na dose de 10 mg/Kg, SID, por via sub-cutânea, nos dias 1, 2 e 8 após o diagnóstico (FIENI, 2014; FIENI, 2006).

- Grupo tratamento **Associação:** constituído de fêmeas (n=5) para as quais foi instituído tratamento medicamentoso com aglepristone (Alizin® -30 mg / 100 mL -

VIRBAC, Carros, França) na dose de 10 mg/Kg, SID, por via subcutânea, nos dias 1, 2 e 8 após o diagnóstico (FIENI, 2014; FIENI, 2006), além da administração de prostaglandina sintética (Ovolute® - 7,5 mg / 100 mL – DRAG PHARMA, Santiago, Chile), na dose de 1 µg/kg (FIENI, 2014; FIENI, 2006), SID, por via intramuscular durante 7 dias.

Para as cadelas submetidas a protocolo terapêutico (Grupo Aglepristone e Associação), a OHE foi realizada no 9º dia após o diagnóstico.

Tabela 12 - Descrição da raça e idade das fêmeas constituintes dos grupos experimentais.

CADELA	GRUPO	RAÇA	IDADE
1	Aglepristone	Daschund	8
2	Aglepristone	Weimaraner	8
3	Aglepristone	Lhasa Apso	9
4	Aglepristone	SRD	7
5	Aglepristone	SRD	8
6	Associação	Boxer	9
7	Associação	SRD	10
8	Associação	SRD	10
9	Associação	SRD	4
10	Associação	Labrador	9
11	Controle	SRD	8
12	Controle	Boxer	10
13	Controle	SRD	10
14	Controle	AKITA	15
15	Controle	SRD	10
16	Controle	Poodle	10
17	Controle	SRD	15

5.1.2 Análise do Poder de Teste

A análise do poder do teste foi realizada pelo aplicativo SAS Power and Sample Size (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), utilizando valores de médias e erro padrão de duas variáveis experimentais (índice de resistividade da artéria uterina direita e esquerda) nos dias 1, 2 e 8 do tratamento. As análises mostraram poder do teste acima de 0,80, demonstrando que o número mínimo de animais (n=5) assegura o valor científico do presente experimento (Tabela 13).

Tabela 13 - Poder do Teste e respectivas unidades experimentais (n) nos grupos experimentais (Aglepristone, Associação e Controle) para as variáveis de índice de resistividade da artéria uterina direita e esquerda.

	Índice de resistividade Direita		**Índice de resistividade Esquerda**	
Grupos	n	Poder do teste	n	Poder do teste
Aglepristone	5	0,874	5	0,83
Associação	5	0,874	5	0,83
Controle	7	0,874	7	0,83

5.1.3 Avaliação Ultrassonográfica

O exame de ultrassonografia foi realizado nos distintos grupos experimentais conforme descrito no Capítulo 1, sempre no momento pré-cirúrgico.

5.1.4 Avaliação Estereológica Uterina

5.1.4.1 Volume Total do Cornos Uterinos

Para a avaliação estereológica do útero, após o procedimento cirúrgico, o volume total de cada corno uterino (Vtotal, cm^3) foi mensurado por método de imersão (SCHERLE, 1970). Ademais, o peso de cada corno uterino foi mensurado por meio de balança digital (SF-400®), com capacidade de 1g a 10000g, após dissecção dos ovários e ligamento largo do útero, para determinação da densidade específica do corno uterino (g/cm^3).

5.1.4.2 Processamento das amostras

Sequencialmente, foram realizados cortes de 2 cm em cada corno uterino (Figura 20) e os fragmentos foram selecionados sistematicamente e randomicamente, de forma a respeitar uma lógica matemática, ou seja, um a cada 2 fragmentos foi selecionado e coletado. Os fragmentos selecionados foram, então, seccionados em seu eixo longitudinal e transversal alternadamente, resultando em 4 sub-fragmentos, dispostos em fileira para serem novamente amostrados, seguindo o mesmo padrão sistemático da etapa anterior (1/2), resultando em 1 a 4 agrupamentos de 3 a 5 sub-fragmentos (Figura 20).

Figura 20 – Sistemática para a amostragem uniforme e randômica dos fragmentos dos cornos uterinos submetidos à avaliação esterológica (SUR).

As amostras foram fixadas em formol 10%, em média por 40 horas, e posteriormente armazenadas em álcool 70% para inclusão em parafina, de forma que fosse possível visibilizar as distintas regiões uterinas (endométrio, miométrio e perimétrio). Sequencialmente, foi realizado processo adaptado de desidratação e diafanização.

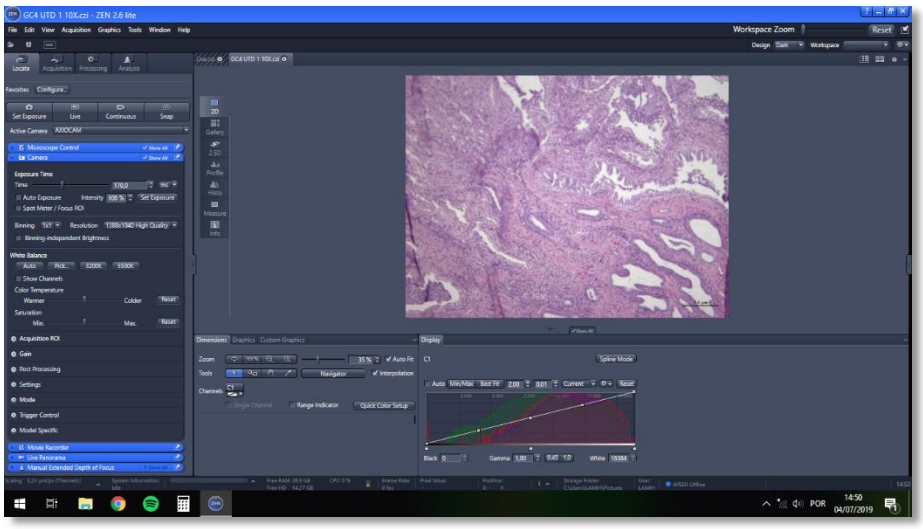
Com auxílio de micrótomo rotativo (LEICA RM2265®), cortes histológicos com espessura de 5 micrômetros (µm) foram selecionados randomicamente, coletados em lâminas foscas e submetidos ao processo de desparafinização e corados com hematoxilina-eosina (VEIGA *et al*., 2017).

5.1.4.3 Volume das Regiões Uterinas

Para estimar o volume de cada região uterina, ou seja, Miométrio (M), Endométrio (E) e Cistos (C), as lâminas foram fotografadas, considerando-se, em média, 10 campos aleatórios, com auxílio do equipamento OLYMPUS BX60® com câmera Zeiss AxioCam HRc®, em objetiva de pequeno aumento (4x) de maneira que

o tecido pudesse ser visibilizado em sua extensão total, com auxílio do *software* Zen Blue 2.6® (Figura 21).

Figura 21 - Visibilização do corte histológico com auxílio do software Zen Blue 2.6®.



O volume de cada região uterina foi determinado pelo método da contagem de pontos (HOWARD e REED, 2005; SALINAS, MIGLINO e del SOL, 2017), utilizando o *software* Image J (https://imagej.nih.gov/ij/) para a realização e geração do sistema teste de pontos. Para determinar o volume, foi necessário calcular a fração de volume (Vv) de cada região, aplicando um sistema teste de pontos sobre o corno uterino, em área associada a cada ponto de 420 mm² sobreposto aos cortes. Os pontos incidentes sobre cada uma das regiões foram contados diferencialmente e aplicando-se a fórmula (c) para obter-se as frações de volume (%) de cada região:

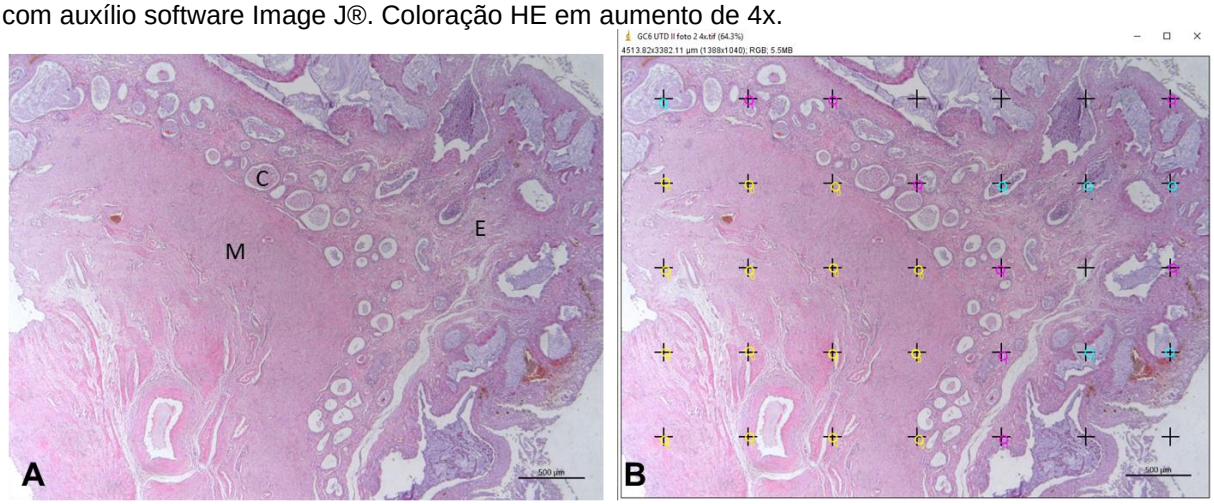
$$\text{(c)} \qquad Vv_{\text{região}} = \sum Pt_{\text{região}} / \sum Pt_{\text{corno}}$$

onde $\sum pt_{\text{região}}$ é a soma de todos os pontos incidentes sobre a região de interesse e $\sum pt_{\text{corno}}$ é o resultado da somatória de todos os pontos incidentes sobre o corno uterino (Figura 22).

O volume total (Vt, cm³) de cada região foi calculado pela multiplicação da fração de volume (Vv, %) de cada região pelo volume total do corno uterino (Vt, cm³) (d):

$$\text{(d)} \qquad Vt_{\text{região}} = Vv_{\text{região}} / Vt_{\text{corno}}$$

Figura 22 – (A) Regiões do corno uterino: miométrio (M), endométrio (E) e cisto (C). Coloração HE em aumento 4x. (B) Estimativa do miométrio (M), endométrio (E) e cisto (C). Geração de sistemas teste com auxílio software Image J®. Coloração HE em aumento de 4x.



5.1.4.4 Composição Volumétrica das Estruturas Endometriais

Para determinação do volume de cada estrutura endometrial, tais como cistos (Ci), estroma (Es), glândulas (G), infiltrado inflamatório (Ii), epitélio luminal (L), vasos (V) e edema (Ed), primeiramente foi determinado a fração de volume (Vv) de cada estrutura pelo sistema de teste de pontos, conforme anteriormente. Nesta avaliação, utilizamos de 4-10 imagens do endométrio, obtidas aleatoriamente em maior aumento (20x) (HOWARD e REED, 2005; SALINAS, MIGLINO e del SOL, 2017). Os pontos incidentes sobre as diferentes estruturas endometriais (E_{est}) foram contados e a fração de volume (Vv) das estruturas estimada, utilizando-se a seguinte equação (e):

$$\text{(e)} \qquad Vv_{est} = \sum Pt_{est} / \sum Pt_{E}$$

onde $\sum Pt_{est}$ é a soma de todos os pontos incidentes sobre a estrutura de interesse e $\sum Pt_{E}$ é o resultado da somatória de todos os pontos incidentes sobre o endométrio.

Posteriormente, o volume total de cada estrutura endometrial (Vt_{est}) foi estimado, multiplicando-se a fração de volume (Vv) pelo volume total do endométrio (Vt_{E}), de acordo com a seguinte fórmula (f):

$$\text{(f)} \qquad Vt_{est} = Vv_{est} \times Vt_{E}.$$

Para todas as análises, no mínimo, 200-300 pontos foram contados.

5.1.4.5 Área de Superfície de Contato das Estruturas Endometriais

Para verificar a densidade de superfície de contato das estruturas endometriais, tais como glândula (G), epitélio luminal (L), vasos (V) e cistos (Ci), utilizou-se o sistema de teste de arcos cicloides, sobreposto nos 10 campos fotografados aleatoriamente com objetiva de médio aumento (20x) (BADDELEY, GUNDERSEN e CRUZ-ORVIT, 1986).

As intersecções entre os arcos testes e os limites da região luminal das estruturas endometriais foram somadas em todos os campos para cada endométrio. A seguinte equação (g) foi utilizada para determinar a densidade de superfície (S_V, cm^{-1}) das estruturas endometriais:

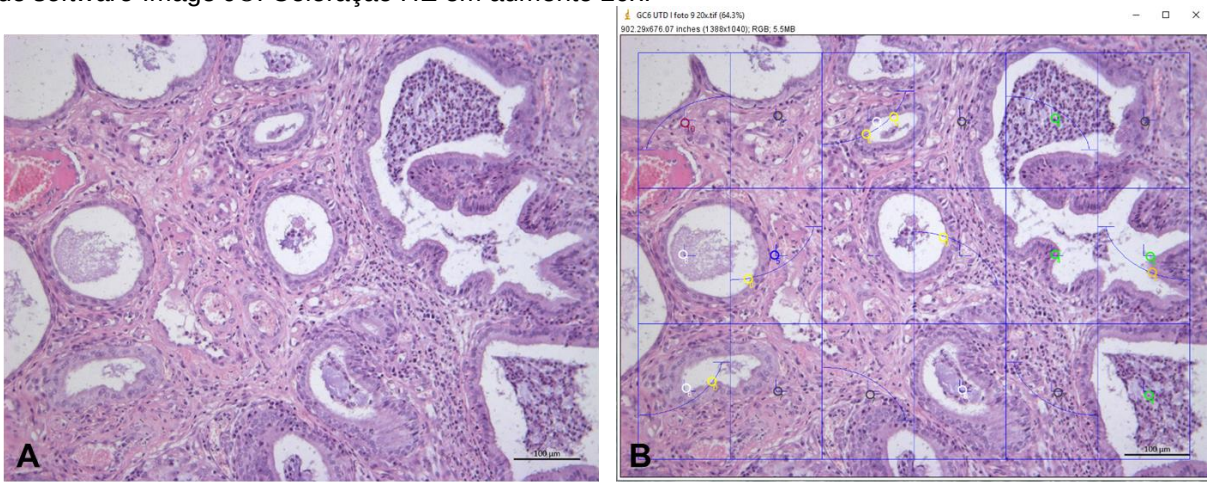
$$\text{(g)} \qquad \text{Est } S_V = 2 \times \sum I_{surf} / (l_p \times \sum P_E)$$

onde $\sum I_{surf}$ é o número total de intersecções entre os arcos cicloides e a superfície da estrutura de interesse, l_p é o comprimento do arco (81,64 µm na escala da imagem) associada a cada ponto e $\sum P_E$ é o número total de pontos que incidem sobre o endométrio (Figura 23).

As áreas de superfície absolutas (S_{surf}, cm^4) foram obtidas multiplicando-se a densidade de superfície (S_V) pelo volume total do endométrio (Vt_E), de acordo com a seguinte equação (h):

$$\text{(h)} \qquad \text{Est } S_{surf} = S_V \times Vt_E.$$

Figura 23 – (A) Fotomicrografia de superfície de contato das estruturas endometriais com auxílio do software Image J®, para estimativa da composição tecidual do endométrio. Coloração HE em aumento 20x. (B) Contagem das intersecções entre os arcos cicloides e a região luminal das estruturas, para estimativa da área de superfície das estruturas endometriais. Geração de sistemas teste com auxílio do *software* Image J®. Coloração HE em aumento 20x.



5.1.5 Avaliação Imunoistoquímica para Expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF –A) no tecido uterino

Cortes histológicos de 5 µm do útero, obtidos em lâminas silanizadas (Starfrost), foram submetidos ao procedimento imunoistoquímico para determinação da imunoexpressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF-A). Os cortes histológicos foram desparafinizados, hidratados e submetidos ao desmascaramento antigênico em tampão citrato (pH 6,0) e em panela de pressão, durante 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de H_2O_2 (10 volumes), a 37°C, por 30 minutos, protegidas da luz. Após lavagens em água corrente, água destilada e em tampão de lavagem (TTBS), foi realizado o bloqueio de proteínas com Protein Block (Novocastra, Leica Biosystems), durante 10 minutos em estufa a 25°C. Após lavagens em TTBS (3x), as lâminas foram incubadas, em câmara úmida escura pelo período de 30 minutos à 37ºC, seguido de 16 horas à 4ºC, com o anticorpo primário anti-VEGF (Abcam, 1:300).

Após incubação, as lâminas foram lavadas em TTBS (3x) e incubadas com o reagente pós-primário (Novocastra, Leica Biosystems), por 30 minutos em temperatura de 20 a 25°C. Após lavagem em TTBS (3x), o polímero Novolink™ Max Polymer Detection System (Novocastra, Leica Biosystems) foi aplicado por 30 minutos em temperatura de 20 a 25°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em TTBS (3x) e reveladas pelo cromógeno tetracloreto de 3-3’ diaminobenzidina (DAB, Novocastra, Leica Biosystems) por 5 minutos e em temperatura ambiente.

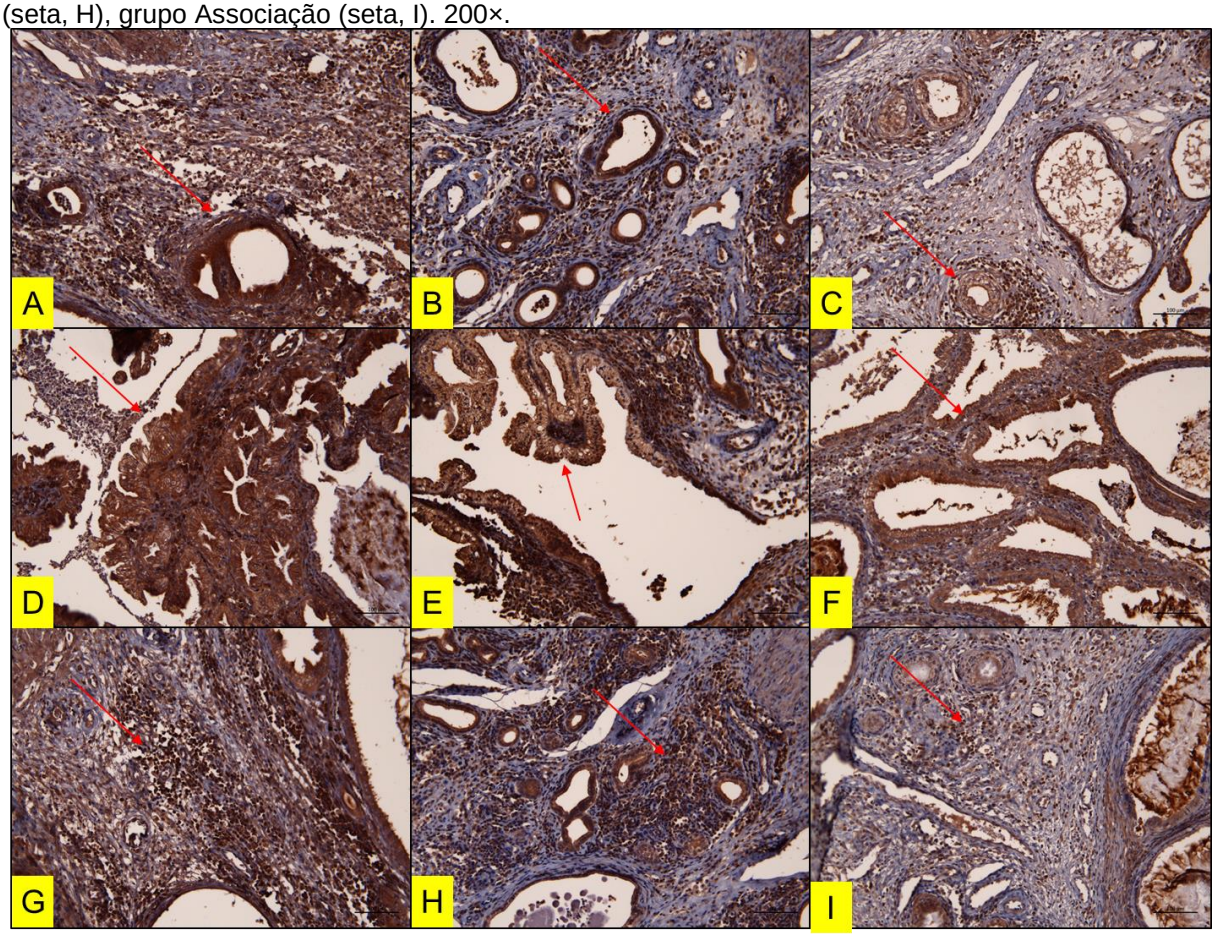
Após lavagens em água corrente e destilada, as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris (Merck), lavadas em água corrente e destilada e realizados 2 banhos rápidos em água amoniacal (0,5%). Por fim, as lâminas foram submetidas à bateria de desidratação e diafanização. Para montagem, utilizou-se lamínulas e a resina *Permount* (ThermoFischer). Todas as reações foram acompanhadas de tecidos para os controles positivo e negativo. Este último foi realizado pela omissão do anticorpo primário da reação e substituição pelo diluente.

A avaliação foi realizada por dois operadores e a análise transcorreu em equipamento OLYMPUS BX60® com câmera Zeiss AxioCam HRc®, em objetiva de pequeno aumento (20x), com auxílio do *software* Zen Blue 2.6®. Portanto, para

análise, o tecido endometrial foi dividido em 3 grupos distintos: epitélio do lúmen, epitélio glandular e células presentes no estroma (VEIGA *et al.,* 2017) (Figura 24).

Para avaliação do epitélio luminal e glandular, foram utilizados 12 campos aleatórios no microscópio, sendo utilizado a classificação descrita por Veiga *et al.* (2017). Desta maneira, a análise foi realizada utilizando as relações entre variáveis: porcentagem de área conservada (0: negativa a 5%, 1: 5-33%; 2: 33-66%; 3: acima de 66%) e intensidade de coloração (0-negativo, 1-fraco, 2-moderado, 3 intenso), e uma pontuação foi definida pelo seguinte cálculo: Pontuação= Porcentagem de intensidade de coloração x colorada.

Figura 24 Figura - Imunocoloração citoplasmática para VEGF-A no epitélio glandular no grupo Controle (seta, A), grupo Aglepristone (seta, B) e grupo de Associação (seta, C). Imunocoloração no epitélio luminal no grupo Controle (seta, D), grupo Aglepristone (seta, E) e grupo Associação (seta, F). Imunocolorao em infiltrado inflamatório do estroma no grupo Controle (seta, G), grupo Aglepristone (seta, H), grupo Associação (seta, I). 200×.



5.1.6 Análise Estatística

Todos os dados foram avaliados utilizando o Sistema SAS para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Pelo aplicativo Guided Data Analisys, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias. Quando não obedeceram a tais premissas, foram transformados de acordo com sugestões do aplicativo (logaritmo na base 10 - Log10X; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X2, Arco seno – arcsin (X); entre outras) e quando a normalidade não foi obtida, empregou-se, então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para a avaliação do Doppler modo-B e colorido, os dados foram avaliados pele teste ANOVA na comparação entre os tratamentos.

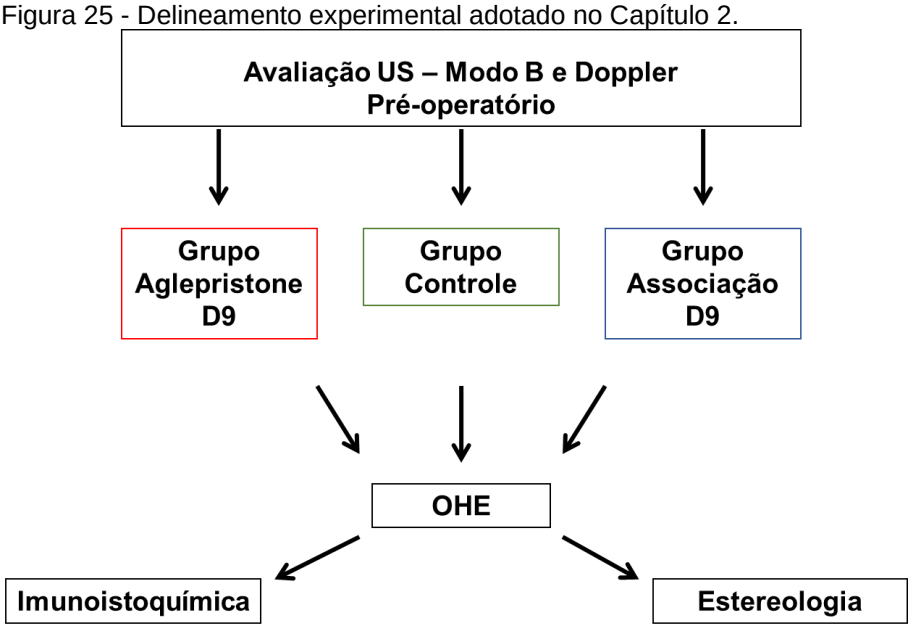
Para a avaliação de Doppler Espectral, imunoistoquímica e estereologia, os dados foram avaliados de acordo com um fatorial 3x2, sendo os fatores: o tratamento (controle vs. aglepristone vs. associação) e grau de acometimento (artéria mais comprometida vs. menos comprometida). Não havendo interações duplas, foi utilizado teste ANOVA / LSD na comparação entre os tratamentos (independentemente do grau de comprometimento) e teste T de Student / Wilcoxon entre os graus de comprometimento da artéria uterina (independentemente do tratamento).

As variáveis respostas foram também submetidas à análise de correlação de Spearman. Os resultados foram descritos como a média e erro padrão para as variáveis paramétricas e mediana e quartis nas variáveis não paramétricas. O nível de significância utilizado foi de 5%.

5.1.7 Delineamento Experimental do Capítulo 2

A determinação das variáveis seguiu um padrão de amostragem previamente definido (Figura 24).

Figura 25 - Delineamento experimental adotado no Capítulo 2.



5.2 RESULTADOS

5.2.1 Interações Estatísticas

Não foram observadas interações triplas entre os grupos de tratamento (Aglepristone, Associação e Controle) e o Grau de comprometimento da artéria uterina (mais comprometida e menos comprometida) para as variáveis obtidas por avalição ultrassonográfica em Doppler Espectral e para Densidade Específica dos cornos uterinos (DE; g/cm³) (Tabela 14).

Tabela 14 - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Aglepristone VS. Associação VS. Controle) e o Grau de comprometimento (mais e menos comprometida).

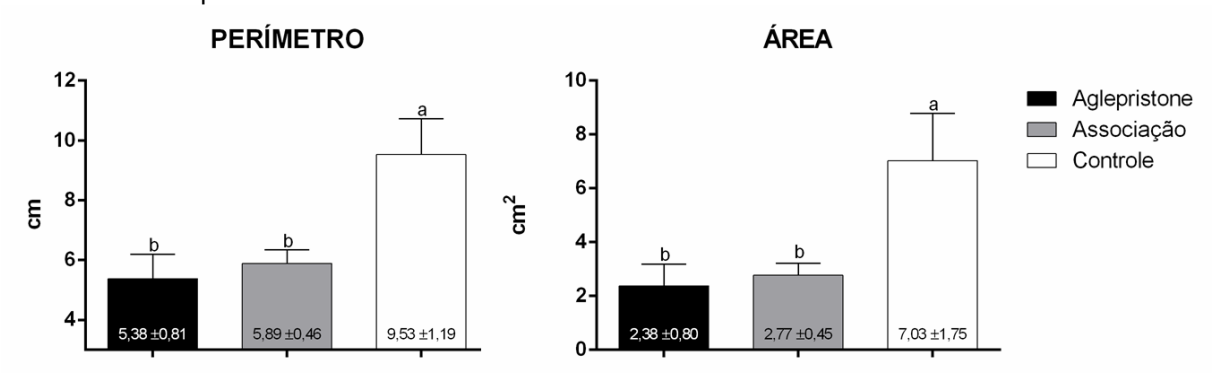
VARIÁVEL	GRUPO	GRAU	GRUPO x GRAU
PS	**0,02**	0,82	**0,07**
ED	0,10	0,26	**0,07**
TAMAX	0,83	0,31	**0,04**
PI	**0,0002**	0,16	0,43
RI	**<,0001**	0,19	0,23
SD	**<,0001**	0,16	0,42
DE	**0,0043**	0,16	**0,07**
VvM	0,28	0,59	0,92
VvE	**0,070**	0,390	0,537
VvC	0,73	0,17	0,50
VTM	0,10	0,66	0,86
VTE	0,49	0,58	0,94

VTC	0,23	0,60	0,62
SvG	0,18	**0,042**	0,58
SvL	0,47	0,62	0,39
SvV	**0,098**	0,925	0,993
SvC	**0,0036**	0,69	0,71
STG	0,53	0,26	0,85
STL	0,35	0,96	0,63
STV	0,11	0,96	1,00
STC	**0,0462**	0,92	0,97
VvCi	**0,014**	0,90	0,74
VvES	**0,0097**	0,91	0,88
VcG	0,18	0,24	0,82
VvI	**0,03**	0,24	0,71
VvL	0,41	0,89	0,42
VvV	0,77	0,48	0,85
VvED	0,33	**0,0184**	0,609
VTCi	**0,0735**	0,79	0,79
VTES	0,44	0,66	0,95
VTG	0,38	0,47	0,97
VTI	0,12	0,45	0,79
VTL	0,46	0,90	0,54
VTV	0,67	0,52	0,84
VTED	0,56	**0,0366**	0,96
IL	0,10	0,6421	0,75
IG	**<,0001**	0,50	0,61
II	**0,0105**	0,40	0,51

5.2.2 Avaliação Ultrassonográfica

Para a área e perímetro dos cornos uterinos, houve diferença estatística entre ambos protocolos de tratamento medicamentoso, Aglepristone e Associação, em comparação ao grupo Controle (Figura 25).

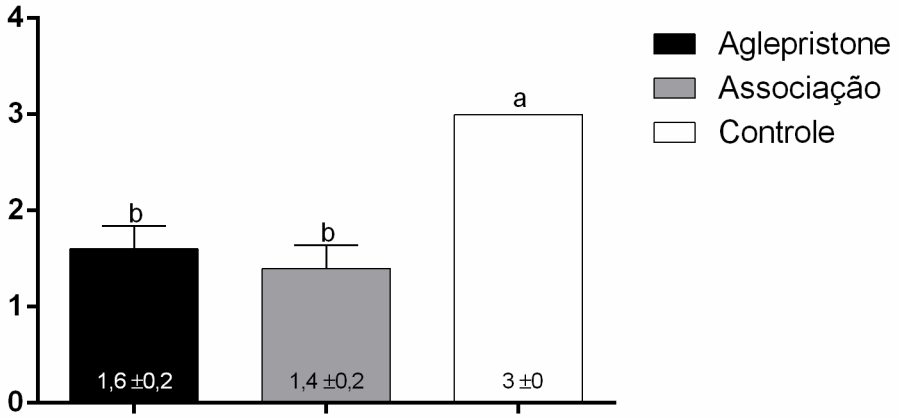
Figura 26 - Média e erro padrão da área (cm²) e perímetro uterino (cm) nos distintos grupos experimentais.



a-b indica diferença significativa entre grupos (p<0,05).

Em relação ao escore de vascularização uterino, os grupos de tratamento medicamentoso, Aglepristone e Associação, apresentaram menores valores em comparação ao grupo Controle (Figura 26).

Figura 27 – Média e erro padrão de escore de vascularização (0-3) nos distintos grupos experimentais.

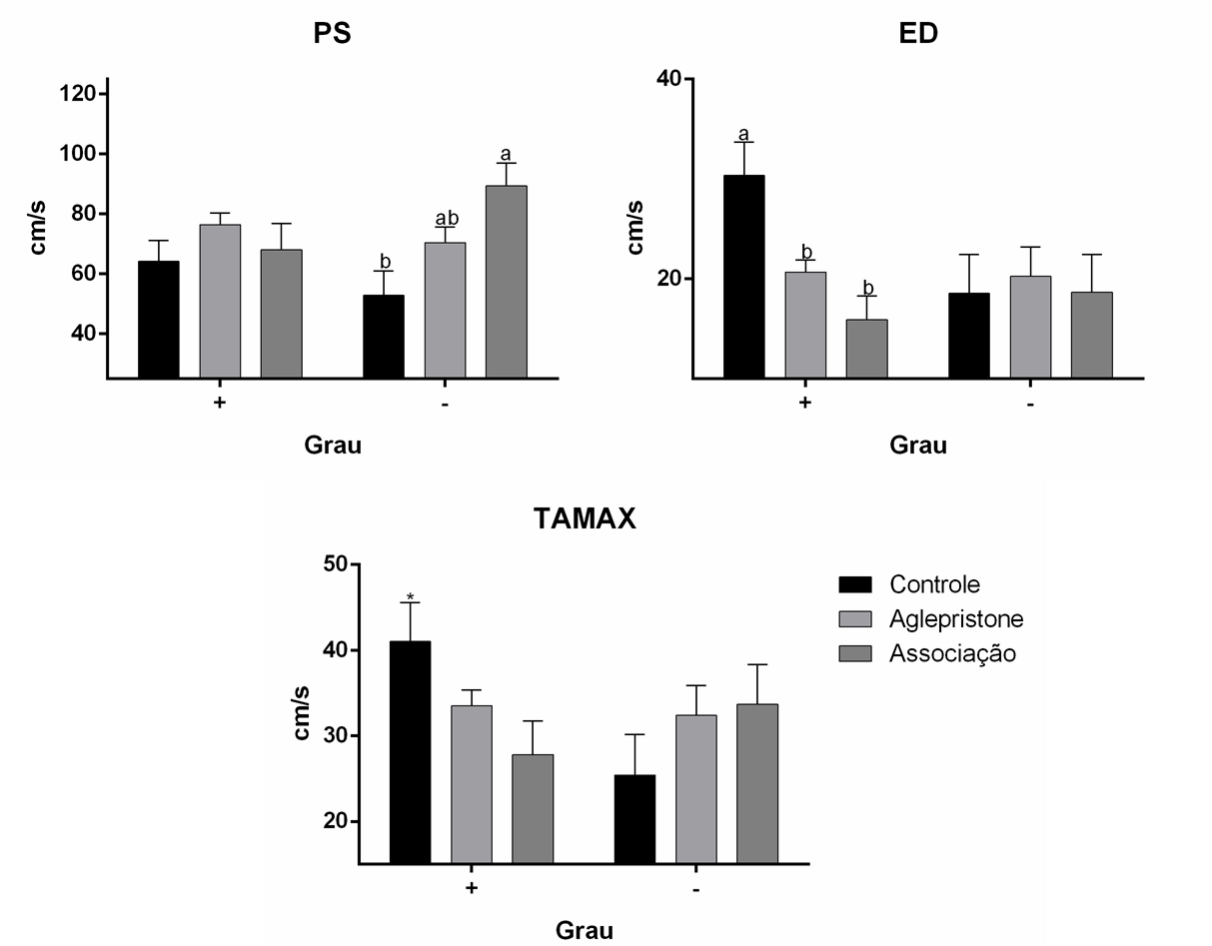


a-b indica diferença significativa entre grupos (p<0,05).

Na avaliação do fluxo sanguíneo da artéria uterina, foi observado diferença estatística no pico da velocidade sistólica (PS) entre o grupo Associação (89,49 ±7,57) e Controle (52,84 ±8,11) na artéria uterina menos comprometida. No entanto, foi observada diferença estatística na velocidade diastólica final (ED) entre os grupos Aglepristone (20,69 ±1,20) e Associação (15,93 ±2,39) em comparação ao grupo Controle (30,35 ±3,36) na artéria mais comprometida. Em relação à velocidade média de um ciclo cardíaco (TAMAX), houve apenas diferença entre as artérias mais (41,02 ±4,52) e menos (25,42 ±4,76) comprometidas no grupo Controle (Figura 27). Não foi observada diferença estatística entre as artérias mais e menos comprometidas nas

variáveis PS e ED. Ainda, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais na artéria mais comprometida para as variáveis PS e TAMAX, e na artéria menos comprometida para a variável ED.

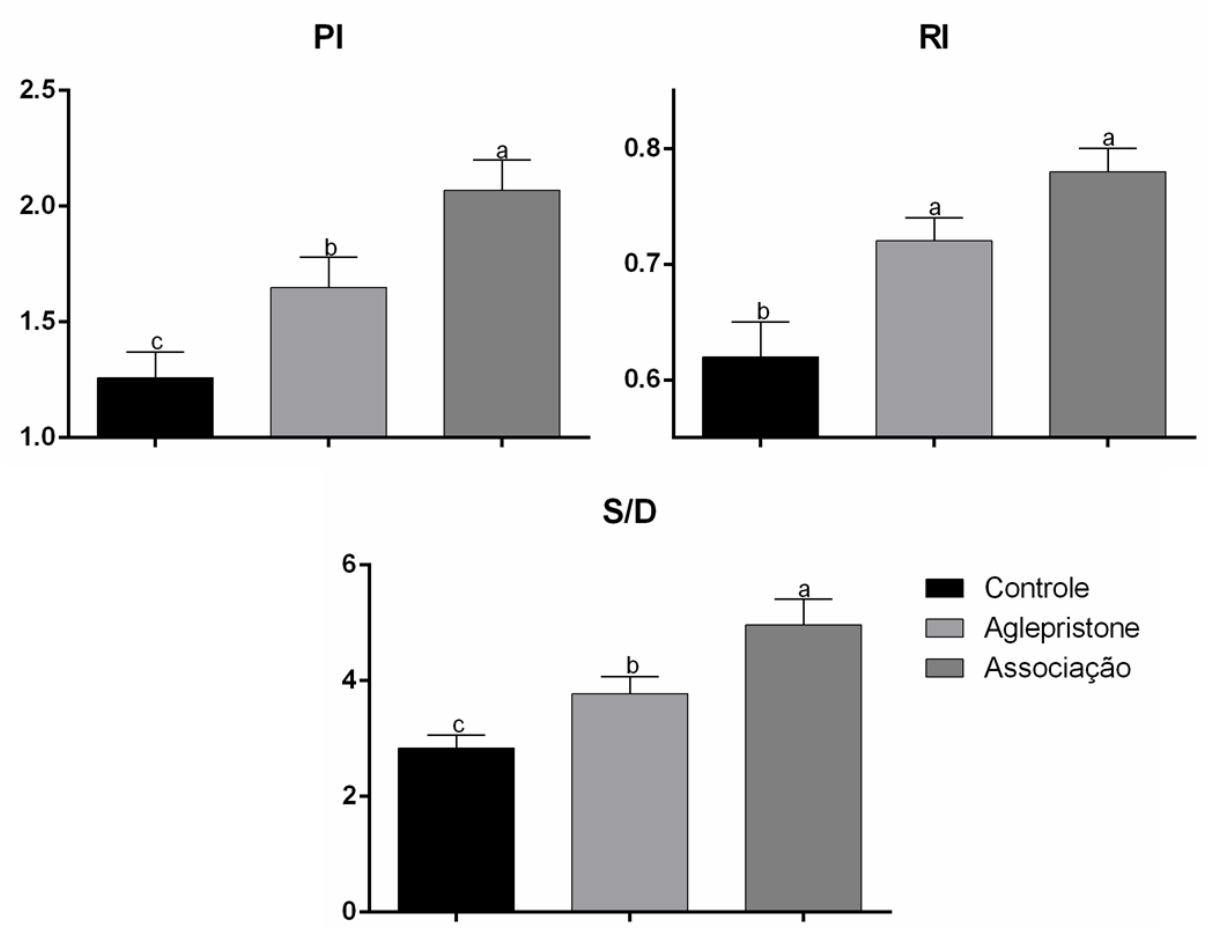
Figura 28 – Média e erro padrão do pico da velocidade sistólica (PS), velocidade diastólica final (ED) e velocidade média de um ciclo cardíaco (TAMAX) nos distintos grupos experimentais.



*indica diferença significativa entre os graus de acometimento (p<0,05). a-b indica diferença significativa entre grupos (p<0,05).

Para os índices hemodinâmicos da artéria uterina, os grupos experimentais, Aglepristone (1,65 ±0,13; 3,78 ±0,29), Associação (2,07 ±0,13; 4,97 ±0,44) e Controle (1,26 ±0,11; 2,84 ±0,22) foram distintos entre si para o índice de pulsatilidade (PI) e relação sístole/diástole (S/D), respectivamente. Por outro lado, para o índice de resistividade (RI), houve diferença estatística entre os grupos Aglepristone (0,72 ±0,02) e Associação (0,78 ±0,02) em comparação ao grupo Controle (0,78 ±0,02) (Figura 28). Não foram observadas diferenças estatísticas quando comparadas as artérias mais e menos comprometidas para as variáveis PI, RI e S/D.

Figura 29 - Média e erro padrão do índice de pulsatilidade (PI), índice de resistividade (RI) e relação sístole/diástole (S/D) nos distintos grupos experimentais.

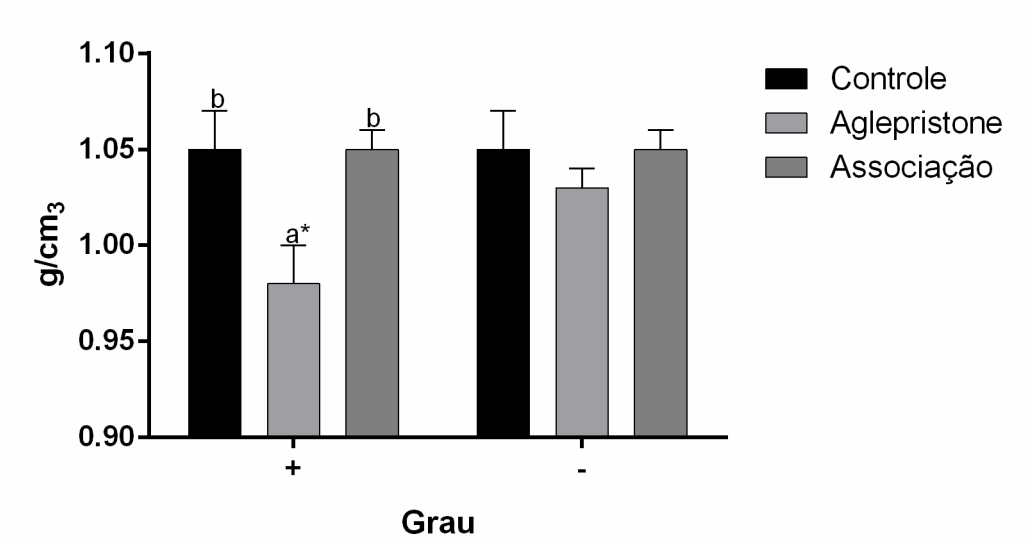


a-c indica diferença significativa entre grupos (p<0,05).

5.2.3 Avaliação Estereológica

A densidade específica uterina no grupo Aglepristone (0,98 ±0,02) foi estatisticamente inferior em comparação aos grupos Associação (1,05 ±0,01) e Controle (1,05 ±0,02) para o corno uterino mais comprometido (Figura 29). Ademais, no grupo Aglepristone, o corno uterino mais acometido (0,98 ±0,02) apresentou menor densidade específica em comparação ao menos acometido (1,03 ±0,01) (Figura 29).

Figura 30 – Média e erro padrão da densidade específica dos cornos uterinos mais e menos comprometidos nos distintos grupos experimentais.



a-b indica diferença significativa entre grupos (p<0,05).

Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais para as frações de volume (Vv) e volume total (VT) das regiões uterinas (Miométrio, M; Endométrio, E; Cisto, C) (Tabela 15), bem como quando comparado o corno uterino mais e menos comprometido (Tabela 16).

Tabela 15 - Média e erro padrão da fração de volume (Vv) e Volume Total (VT) das regiões uterinas nos distintos grupos experimentais.

VARIÁVEL	CONTROLE	AGLEPRISTONE	ASSOCIAÇÃO	P
VvM	45,81 ±2,71	40,4 ±3,34	40,35 ±2,47	0,25
VvE	39,06 ±1,85	44,57 ±3,20	47,44 ±2,76	0,06
VvC	15,14 ±2,17	15 ±4,13	12,21 ±2,07	0,73
VTM	36,11 ±6,13	21,34 ±4,48	20,95 ±3,79	0,08
VTE	32,04 ±6,04	21,21 ±3,05	24,27 ±4,07	0,46
VTC	10,5 ±1,73	5,62 ±1,07	7,53 ±2,53	0,21

Fração de volume do miométrio (VvM); Fração de volume do endométrio (VvE); Fração de volume de cisto (VvC); Volume total de miométrio (VTM); Volume total de endométrio (VTE); Volume total de cisto (VTC).

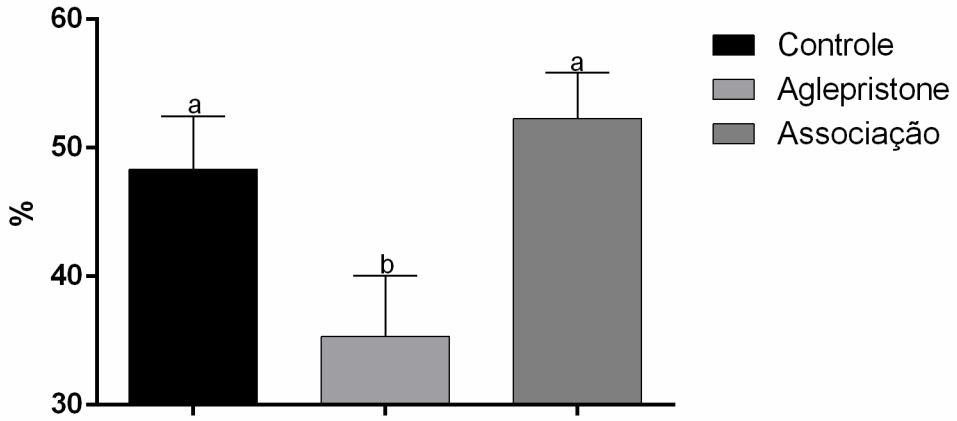
Tabela 16 - Média e erro padrão da fração de volume (Vv) e Volume Total (VT) das regiões uterinas nos distintos graus acometimento.

VARIÁVEL	+		P
VvM	43,59 ±2,47	41,63 ±2,31	0,58
VvE	44,19 ±2,22	42,09 ±2,18	0,50
VvC	12,19 ±1,56	16,28 ±2,73	0,21
VTM	30,46 ±5,51	24,15 ±3,42	0,61
VTE	26,91 ±3,44	26,23 ±4,89	0,55
VTC	7,35 ±1,34	9,03 ±1,77	0,71

Fração de volume do miométrio (VvM); Fração de volume do endométrio (VvE); Fração de volume de cisto (VvC); Volume total de miométrio (VTM); Volume total de endométrio (VTE); Volume total de cisto (VTC).

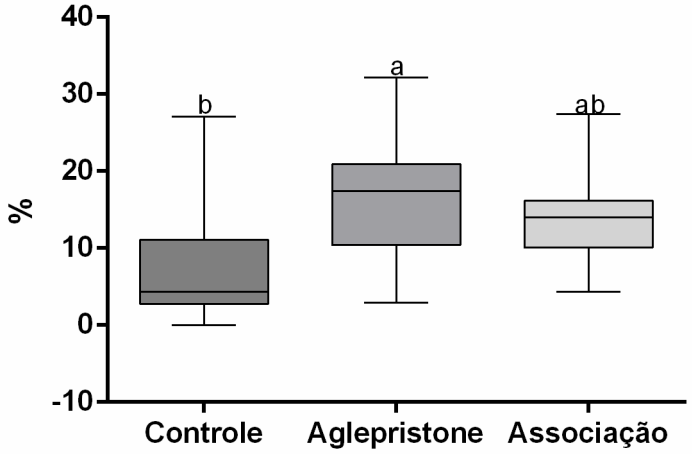
O grupo Aglepristone (35,33 ±4,74) apresentou menor fração de volume (Vv) do infiltrado inflamatório (Ii) em comparação aos grupos Controle (48,35 ±4,08) e Associação (52,28 ±3,59) (Figura 30). Ademais, o grupo Aglepristone [17,39 (10,38;20,95)] apresentou maior fração de volume (Vv) do estroma uterino (Es) em relação ao grupo Controle [4,32 (2,78;11,11)] (Figura 31).

Figura 31 - Média e erro padrão da fração de volume (Vv) do infiltrado inflamatório (Ii) nos distintos grupos experimentais.



a-b indica diferença significativa entre grupos (p<0,05).

Figura 32 – Mediana e quartis (q1;q3) da fração de volume (Vv) do estroma uterino (Es) nos distintos grupos experimentais.

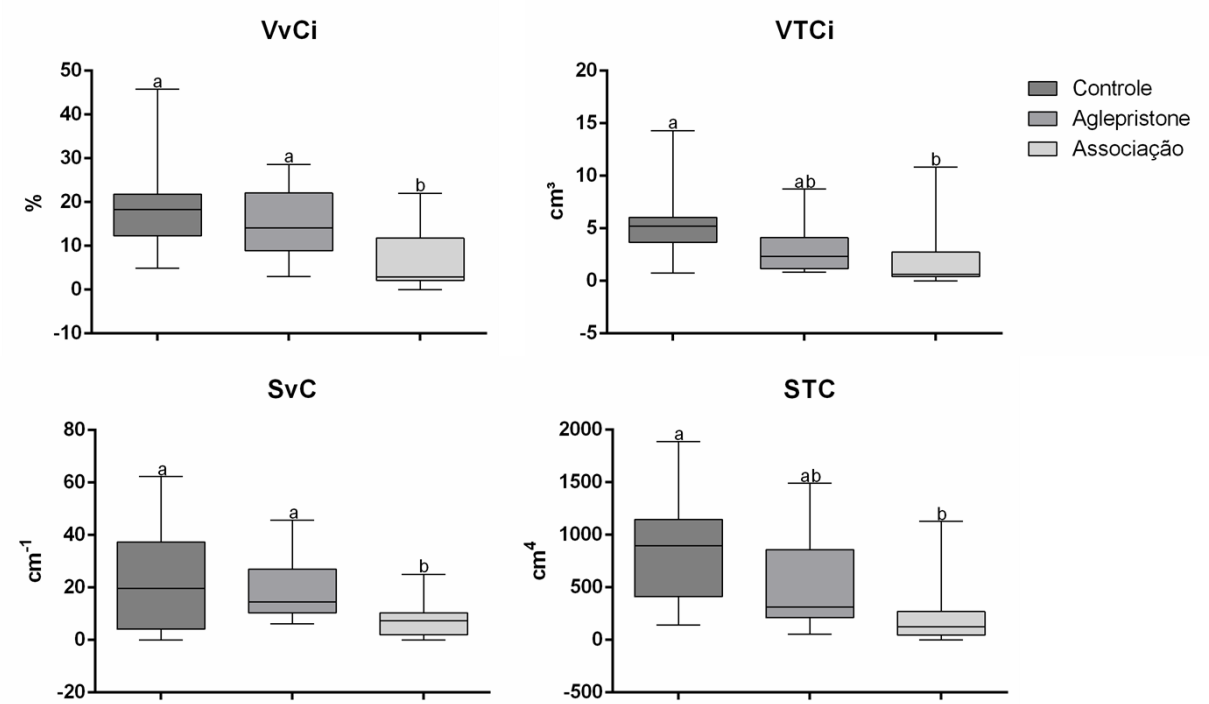


a-b indica diferença significativa entre grupos (p<0,05).

Na avaliação da fração de volume (Vv) cístico e densidade de superfície cística (SvCi), o grupo Associação foi inferior aos grupos Aglepristone e Controle (Figura 32). Ademais, o grupo Associação apresentou menor volume total (VT) cístico e área de superfície absoluta em comparação ao grupo Controle (Figura 32). O corno uterino menos acometido apresentou maior fração de volume (Vv) e volume total (VT) de edema (Ed), em comparação ao corno uterino mais acometido (Figura 33).

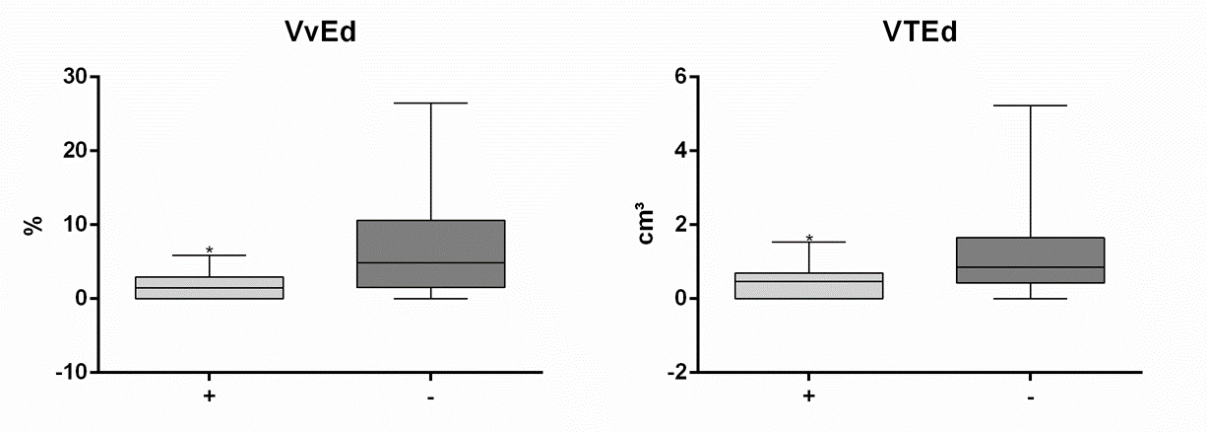
Não foram observadas diferenças estatísticas para as demais variáveis estereológicas na comparação entre os grupos experimentais e graus de acometimento.

Figura 33 – Mediana e quartis (q1;q3) da fração de volume (Vv), volume total (VT), densidade de superfície (Sv) e área de superfície absoluta (ST) do cisto nos distintos grupos experimentais.



a-b indica diferença significativa entre grupos (p<0,05).

Figura 34 – Mediana e quartis (q1;q3) da fração de volume (Vv) e volume total (VT) do edema uterino (Ed) nos distintos graus de acometimento.

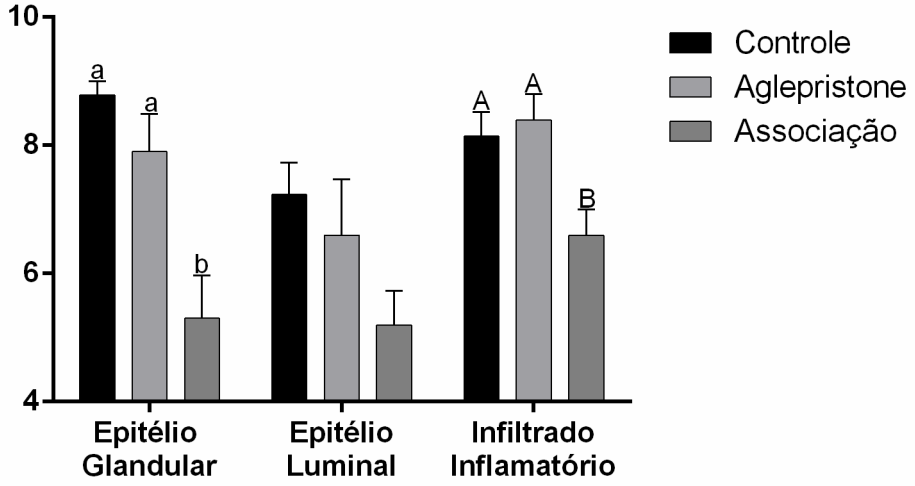


* indica diferença significativa entre os distintos graus de acometimento (p<0,05).

5.2.3 Avaliação Imunohistoquímica para o VEGF-A

Houve menor expressão do VEGF-A na região do epitélio glandular (5,3 ±0,67) e do infiltrado inflamatório (6,6 ±0,40) no grupo Associação, em comparação aos demais grupos experimentais (Figura 34). Não houve diferença entre o corno uterino mais e menos acometido para todas as regiões endometriais.

Figura 35 – Média e erro padrão da expressão do VEGF-A em diferentes regiões uterinas nos distintos grupos experimentais.



a-b indica diferença significativa entre grupos para o epitélio glandular (p<0,05).
A-B indica diferença significativa entre grupos para o infiltrado inflamatório (p<0,05).

5.2.4 Análise de Correlação

A análise de correlação entre as variáveis-respostas foi realizada considerando todos os animais, independentemente do efeito do tratamento (Apêndices C).

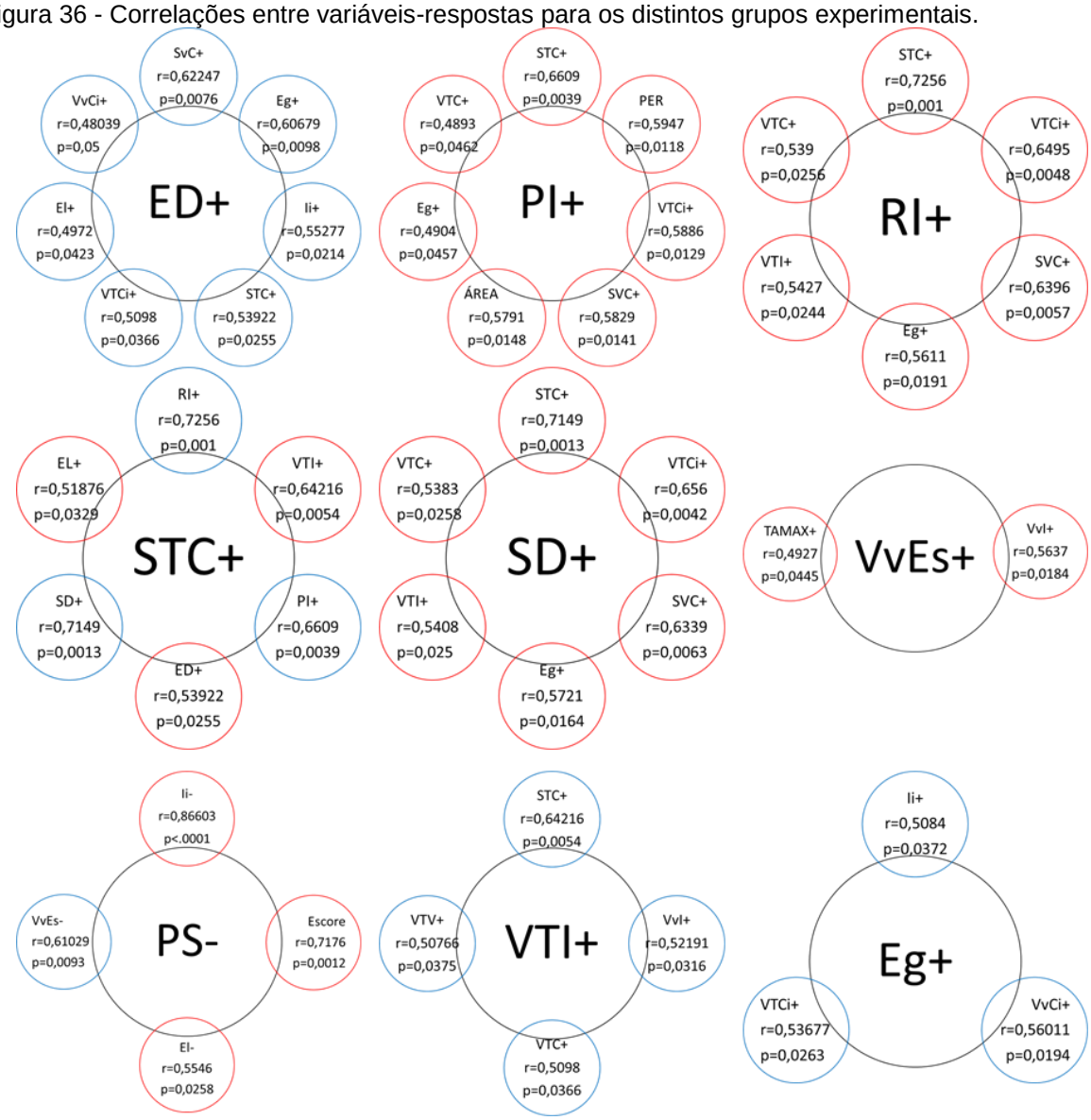
Independente do grupo experimental, o PS da artéria uterina mais acometida correlacionou-se positivamente com a fração de volume do estroma do corno uterino menos acometido (r=0,61; p=0,009), além da correlação negativa com o escore de vascularização (r=-0,71; p=0,001), com expressão do VEGF-A no infiltrado inflamatório (Ii) (r=-0,86; p<0,0001) e a expressão no epitélio luminal (r=-0,55; p=0,02) do corno uterino mais acometido. O ED da artéria mais acometida correlacionou-se positivamente com a densidade de superfície de cisto (SvC) (r=0,62; p=0,007), expressão do VEGF-A no epitélio glandular (Eg) (r=0,60; p=0,009), Ii (r=0,55; p=0,02), área de superfície absoluta de cisto (STC) (r=0,53; p=0,02), volume total de cisto (VTCi) (r=0,50; p=0,03), El (r=0,49; p=0,04) e fração de volume de cisto (VvCi) (r=0,48; p=0,05) do corno uterino mais acometido. Houve correlação negativa entre a variável PI da artéria uterina mais acometida com o perímetro uterino (r=-0,59; p=0,01), área uterina (r=-0,57; p=0,01), STC (r=-0,66; p=0,003), VTCi (r=-0,58;

p=0,01), SvC (r=-0,58; p=0,01), Eg (r=-0,49; p=0,04) e volume total de cisto (VTC) (r=-0,48; p=0,04) do corno uterino mais acometido (Figura 35).

O RI da artéria uterina mais acometida correlacionou-se negativamente com STC (r=-0,72; p=0,001), VTCi (r=-0,64; p=0,004), SvC (r=-0,63; p=0,005), Eg (r=-0,56; p=0,01), volume total de infiltrado inflamatório (VTI) (r=-0,54; p=0,02) e VTC (r=-0,53; p=0,02) do corno uterino mais acometido. O SD da artéria uterina mais acometida correlacionou-se negativamente com STC (r=-0,71; p=0,001), VTCi (r=-0,65; p=0,004), SvC (r=-0,63; p=0,006), Eg (r=-0,57; 0,01), VTI (r=-0,54; p=0,02) e VTC (r=-0,53; p=0,02) do corno uterino mais acometido. A STC do corno uterino mais acometido teve correlação negativa com VTI (r=-0,64; p=0,005) e EI (r=-0,51; p=0,03) do corno uterino mais acometido. O Eg do corno uterino mais acometido correlacionou-se positivamente com Ii (r=0,50; p=0,03) (Figura 35).

A fração de volume do estroma (VvEs) do corno uterino mais acometido teve correlação negativa com o TAMAX da artéria uterina mais acometida (r=-0,49; p=0,04) e com a fração de volume de infiltrado inflamatório (VvI) do corno uterino mais acometido (r=-0,56; p=0,01). O VTI do corno uterino mais acometido correlacionou-se positivamente com STC (r=0,64; p=0,005), VvI (r=0,52; p=0,03), VTC (r=0,50; p=0,03) e com o volume total de vasos (VTV) (r=0,506; p=0,03) do corno uterino mais acometido (Figura 35).

Figura 36 - Correlações entre variáveis-respostas para os distintos grupos experimentais.



Círculos azuis indicam correlação positiva e círculos vermelhos indicam correlação negativa.

5.3 DISCUSSÃO

Até o momento, não há trabalhos em literatura com o principal escopo de comparar distintos tratamentos medicamentosos, em relação à abordagem cirúrgica para a piometra em cadelas. Portanto, os achados relativos à modulação do fluxo sanguíneo, hemodinâmica da artéria uterina, características morfométricas e angiogênicas uterinas também podem ser considerados inéditos.

Neste experimento, conforme esperado, foi constatado menor área e perímetro uterino nos grupos de tratamento medicamentoso, em comparação ao grupo controle (submetido à terapia cirúrgica imediata), indicando eficácia dos tratamentos conservativos, associados ao tratamento de suporte, em reduzir o

diâmetro e conteúdo uterino. Tal resposta pode ser, ainda, corroborada pelo menor escore de vascularização uterino nos grupos de tratamento medicamentoso, em relação ao grupo Controle. No entanto, é importante ressaltar que, a despeito da melhora no quadro clínico, a vascularização uterina difere daquela evidenciada para cadelas em diestro fisiológico e assemelha-se ao descrito por Veiga *et al*. (2017) para cadelas com HEC-mucometra. Portanto, acreditamos que os protocolos de tratamento conservativo possam contribuir para a melhora no grau de vascularização uterina, porém, não retornando à condição fisiológica. Para tanto, sugerimos a investigação a longo prazo da dinâmica vascular uterina, inclusive estendendo-se ao período de anestro.

Comparando-se os protocolos de tratamento medicamentoso, observa-se menor fluxo sanguíneo na artéria uterina [comprovado pelo maior pico da velocidade sistólica (PS), índice de pulsatibilidade (PI), resistividade (RI) e relação sístole/diástole (S/D)] após o término da terapia associativa. Deste modo, pode-se atribuir maior influência da terapia associativa sobre a hemodinâmica uterina, por ação vasoconstritora da PGF2-α (NAKANO e COLE, 1969), em conjunto com a diminuição do processo inflamatório, responsável por aumentar o fluxo sanguíneo no local afetado. De fato, observamos correlação negativa entre o volume total de infiltrado inflamatório endometrial (VTI) e o escore de vascularização uterina e índice de resistividade (RI) da artéria uterina. Ademais, valores de ED, PI, RI e S/D assemelham-se aos relatados por Veiga *et al*. (2017) e Batista *et al*. (2016) para cadelas com HEC-mucometra. Desta forma, sugerimos que o uso adicional da PGF2-α no tratamento para piometra contribui de forma significativa para a redução do processo inflamatório local, porém, não reduz totalmente o desenvolvimento endometrial característico da HEC.

Nas cadelas do Grupo Controle, o corno uterino mais comprometido apresentou maior velocidade média de um ciclo cardíaco (TAMAX), sugerindo disfunção vascular adicional no local de maior alteração inflamatória. Com efeito, observamos correlação negativa entre o TAMAX e a fração de volume do estroma uterino (VvEs), sugerindo que a alteração morfológica do tecido uterino modifica o padrão vascular do órgão. Em relação à integridade endometrial, verificamos, ainda, que o grupo Aglepristone apresentou maior volume de estroma uterino (maior área estromal íntegra, aproximadamente 18%) em relação ao controle (aproximadamente 4%), porém inferior ao relatado para cadelas nulíparas (62,42%, Salinas, Miglino e del

Sol, 2017). Ademais, somente o Grupo Aglepristone apresentou redução significativa da porcentagem de infiltrado inflamatório no estroma uterino e menor densidade específica no corno uterino mais comprometido, em comparação ao grupo controle. Portanto, a administração de aglepristone contribui significativamente para reestruturação do tecido uterino, a despeito da manutenção do desequilíbrio morfométrico do endométrio, em relação à estrutura fisiológica nas cadelas hígidas. Acreditamos, ainda, que a redução na porcentagem de infiltrado inflamatório não tenha sido observada no grupo Associação em função do estímulo da PGF2-α à cascata da inflamação aguda e migração leucocitária (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011).

De acordo com De Bosschere *et al.* (2001), a classificação histológica da piometra caracteriza-se por acentuada invasão estromal de células polimorfonucleares, associada ou não à presença de cistos. Porém, em nosso estudo, as cadelas foram diagnosticadas com piometra, em função dos achados histológicos, mas também portadoras da síndrome hiperplasia endometrial cística-piometra. Desde os primeiros relatos histológicos feitos por Dow (1959), os cistos endometriais são considerados estruturas importantes para a patogenia da síndrome HEC-piometra. Em nosso estudo, verificamos que a presença de cistos endometriais é capaz de modular o fluxo sanguíneo para o útero, pois houve correlações positivas entre a porcentagem estereológica dos cistos e a velocidade de fluxo da artéria uterina (ED e SD), além de correlação negativa com os índices hemodinâmicos da artéria uterina (PI, RI e SD). Desta forma, podemos sugerir que a intensidade de estruturas císticas no endométrio comprometido pela HEC-piometra atua de forma imperativa na hemodinâmica uterina. Ademais, a fração de volume do endométrio no Grupo Controle (39,06±1,85%) assemelhou-se ao relatado (35,01%) por Salinas, Miglino e del Sol (2017) para cadelas hígidas, indicando que a HEC-piometra não altera a composição volumétrica das camadas uterinas.

No presente estudo, foi possível observar decréscimo no volume e superfície cística apenas após a instituição da terapia associativa. Infere-se que tal importante resposta da ação adicional da PGF2-α seja decorrente do maior estímulo à contratilidade uterina. Ainda, observamos correlação positiva entre a intensidade de formação cística e a expressão de VEGF-A no epitélio glandular e apenas a terapia medicamentosa com a associação aglepristone e PGF2-α diminuiu a expressão angiogênica do fator VEGF-A, em comparação ao Grupo Controle. Tais resultados

demonstram a influência conjunta dos cistos endometriais e do processo inflamatório na modulação angiogênica uterina. Takahashi et al. (2010) evidenciaram que o aumento da resistência uterina impede o crescimento do tecido glandular, resultando em diminuição da expressão do VEGF. De fato, em nosso estudo, a expressão do VEGF-A correlacionou-se positivamente com a velocidade de fluxo sanguíneo e negativamente com índices hemodinâmicos da artéria uterina, reforçando que a redução da angiogênese após terapia associativa contribuiu para a diminuição do fluxo sanguíneo para o útero. Tais resultados corroboram a eficácia da terapia conservativa para a piometra em cadelas.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. A terapia medicamentosa, especialmente utilizando o protocolo com Aglepristone, é mais eficaz para reversão das alterações clínico-laboratoriais da piometra;
2. A terapia com Aglepristone é mais eficaz para reversão das alterações medulares da piometra;
3. Os protocolos de tratamento conservativo diminuem de forma significativa a vascularização uterina ao curso da terapia, especialmente o protocolo associativo;
4. A terapia associativa entre aglepristone e prostaglandina é mais eficaz em modular o fluxo sanguíneo e a hemodinâmica da artéria uterina;
5. Os protocolos de tratamento medicamentoso promovem mudanças morfométricas importantes no tecido uterino, em especial, a quantidade de cistos endometriais (para a terapia associativa), infiltrado inflamatório (terapia com aglepristone) e integridade estromal (terapia com aglepristone);
6. A terapia associativa entre aglepristone e prostaglandina é mais eficaz em diminuir a angiogênese uterina.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

BADDELEY, A. J.; GUNDERSEN, H. J. G.; CRUZ-ORIVET, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy,** v. 142, n. 3, p. 259-276, June, 1986.

BAITHALU, R. K.; MAHARANA, B. R.; MISHRA, C.; SARANGI, L.; SAMAL, L. Canine pyometra. **Veterinary world,** v. 3, n. 7, p. 340-342, July, 2010.

BARTOSKOVA, A.; VITASEK, R.; LEVA, L.; FALDYNA, M. Hysterectomy leads to fast improvement of haematological and immunological parameters in bitches with pyometra. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 10, p. 564-568, July, 2007.

BATISTA, P. R.; BLANCO, P. G.; GOBELLO, C. Treatment of canine pyometra with the gonadotropin-releasing hormone antagonist acyline: a case series. **Topics in companion animal medicine**, v. 30, n. 1, p. 25-27, March, 2015.

BATISTA, P. R.; GOBELLO, C.; RUBE, A.; CORRADA, Y. A.; TÓRTORA, M.; BLANCO, P. G. Uterine blood flow evaluation in bitches suffering from cystic endometrial hyperplasia (CEH) and CEH-pyometra complex. **Theriogenology,** v. 85, n. 7, p. 1258-1261, April, 2016.

BALTAZAR, F. N.; CORTEZ, M. B. X.; CIRILLO, T.; TREVISAN, R.; MARQUES JÚNIOR, W.; FRANCO, C. R.; BERL, C. A. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas da secreção uterina de cadelas com piometra atendidas em hospital veterinário localizado em São Paulo, SP, Brasil, no período de 2010 a 2015. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP,** Brasil, v. 16, n. 3, p. 36-42, Dezembro, 2018.

BIGLIARDI, E.; PARMIGIANI, E.; CAVIRANI, S.; LUPPI, A.; BONATI, L.; CORRADI, A. Ultrasonography and cystic hyperplasia–pyometra complex in the bitch. **Reproduction in domestic animals,** Berlin, v. 39, n. 3, p. 136-140, June, 2004.

CARVALHO, C. F.; CHAMMAS, M. C.; CERRI, G. G. Princípios físicos do Doppler em ultra-sonografia. **Ciência Rural,** Brasil, v. 38, n. 3, p. 872-879, Junho, 2008.

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

CONTRI, A.; GLORIA, A.; CARLUCCIO, A.; PANTALEO, S.; ROBBE, D. Effectiveness of a modified administration protocol for the medical treatment of canine pyometra. **Veterinary research communications,** v. 39, n. 1, p. 1-5, October 2015.

CONCANNON, P. W.; HANSEL, W. Prostaglandin F2α induced luteolysis, hypothermia, and abortions in beagle bitches. **Prostaglandins**, v. 13, n. 3, p. 533-542, 1977.

CORRADA, Y.; ARIAS, D.; RODRÍGUEZ, R.; TORTORA, M.; GOBELLO, C. Combination dopamine agonist and prostaglandin agonist treatment of cystic endometrial hyperplasia–pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1557-1559, October, 2006.

CRUZ-ARÁMBULO, R.; WRIGLEY, R. Ultrasonography of the acute abdomen. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 18, n. 1, p. 20-31, February, 2003.

CRUZ-PINTO, C. E.; STOPIGLIA, A. J.; MATERA, J. M.; ARNONI, F. I. Análise da casuística das afecções cirúrgicas observadas na Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais da FMVZ-USP no período de 1988 a 2007. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 41-47, Abril, 2015.

DĄBROWSKI, R.; PASTOR, J.; SZCZUBIAŁ, M.; PIECH, T.; BOCHNIARZ, M.; WAWRON, W.; TVARIJONAVICIUTE, A. Serum IL-6 and IL-10 concentrations in bitches with pyometra undergoing ovariohysterectomy. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, n. 1, p. 61, September, 2015a.

DĄBROWSKI, R.; SZCZUBIAŁ, M.; KOSTRO, K.; WAWRON, W.; CERON, J. J.; TVARIJONAVICIUTE, A. Serum insulin-like growth factor-1 and C-reactive protein concentrations before and after ovariohysterectomy in bitches with pyometra. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 474-477, March, 2015b.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; BROECK, W. V. D.; CORYN, M. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected?. **Theriogenology,** v. 55, n. 7, p. 1509-1519, April, 2001.

DE COCK, H.; DUCATELLE, R.; TILMANT, K.; DE SCHEPPER, J. Possible role for insulin-like growth factor-I in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**, v. 57, n. 9, p. 2271-2287, June, 2002.

DOMOSLAWSKA, A.; JANOWSKI, T.; JURCZAK, A. Course of uterine involution and the level of progesterone in bitches with endometritis-pyometra complex treated with aglepristone. **Bull Vet InstPulawy,** v. 54, p. 19-23, 2010.

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

DOW, Charles. **The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch**. 1960. 340p. Tese de Doutorado. ProQuest Dissertations & Theses, University of Glasgow.

EGENVALL, A.; HAGMAN, R.; BONNETT, B. N.; HEDHAMMAR, A.; OLSON, P.; LAGERSTEDT, A. S. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 15, n. 6, p. 530-538, November, 2001.

ENGLAND, G. C. W.; FREEMAN, S. L.; RUSSO, M. Treatment of spontaneous pyometra in 22 bitches with a combination of cabergoline and cloprostenol. **Veterinary Record**, v. 160, n. 9, p. 293-296, March, 2007.

FALDYNA, M.; LAZNICKA, A.; TOMAN, M. Immunosuppression in bitches with pyometra. **Journal of small animal practice,** v. 42, n. 1, p. 5-10, January, 2001.

FAYRER-HOSKEN, R. A.; MAHAFFEY, M. MILLER-LIEBL, D.; CAUDLE, A. B. Early diagnosis of canine pyometra using ultrasonography. **Veterinary Radiology,** v. 32, n. 6, p. 287-289, November, 1991.

FEITOSA, F. L. Exame Físico Geral ou de Rotina. In: FEITOSA, F. L. **Semiologia Veterinária:** A arte do Diagnóstico. 2ªEd. São Paulo: Roca, 2008. P 65-86.

FIELDER, F. D.; BAKER, R. F. Diagnostic applications of Doppler ultrasound. **Ultrasonics,** v. 7, n. 1, p. 36-38, January, 1969.

FIENI, F. Clinical evaluation of the use of aglepristone, with or without cloprostenol, to treat cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in bitches. **Theriogenology,** v. 66, n. 6, p. 1550-1556, October, 2006.

FIENI, F.; TOPIE, E.; GOGNY, A. Medical treatment for pyometra in dogs. **Reproduction in Domestic Animals,** v. 49, n. s2, p. 28-32, June, 2014.

FLETCHER, J. R.; RAMWELL, P. W.; HERMAN, C. M. Prostaglandins and the hemodynamic course of endotoxin shock. **Journal of Surgical Research**, v. 20, n. 6, p. 589-594, June, 1976.

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

GABRIEL, C.; DEICHSEL, A. B.; HLAVATY, J.; MAIR, G.; WALTER, I. The physiological expression of scavenger receptor SR-B1 in canine endometrial and placental epithelial cells and its potential involvement in pathogenesis of pyometra. **Theriogenology,** v. 85, n. 9, p. 1599-1609, January, 2016.

GERBER, J. G.; NIES, A. S. The hemodynamic effects of prostaglandins in the rat. Evidence for important species variation in renovascular responses. **Circulation research**, v. 44, n. 3, p. 406-410, March, 1979.

GOBELLO, C.; CASTEX, G.; KLIMA, L.; CORRADA, Y. A study of two protocols combining aglepristone and cloprostenol to treat open cervix pyometra in the bitch. **Theriogenology,** v. 60, n. 5, p. 901-908, September, 2003.

GULTIKEN, N.; YARIM, M.; YARIM, G. F.; GACAR, A.; MASON, J. I. Expression of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase in ovarian and uterine tissue during diestrus and open cervix cystic endometrial hyperplasia-pyometra in the bitch. **Theriogenology,** v. 86, n. 2, p. 572-578, February, 2016.

GUPTA, A. K.; DHAMI, A. J.; PATEL, S. B.; SHAH, R. G. Evaluation of clinical biochemistry of blood in bitches affected with pyometra. **Indian J Anim Reprod,** v. 34, p. 26-30, June, 2013.

GÜRBULAK, K.; PANCARCI, Ş. M.; EKICI, H.; KONUK, C.; KIRŞAN, I.; UÇMAK, M.; TOYDEMIR, S. Use of aglepristone and aglepristone+ intrauterine antibiotic for the treatment of pyometra in bitches. **Acta Veterinaria Hungarica,** Budapest, v. 53, n. 2, p. 249-255, July, 2005.

HAGMAN, R. Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, p. 323-325, December, 2012.

HAGMAN, R. Canine pyometra: What is new?. **Reproduction in Domestic Animals,** v. 52, p. 288-292, April, 2017.

HAGMAN, R. Pyometra in small animals. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice,** v. 48, n. 4, p. 639-661, July, 2018.

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

HOLST, B. S.; ROS, L.; HAGMAN, R. A retrospective study of bitches with pyometra, medically treated with aglepristone. **Theriogenology,** v. 82, n. 9, p. 1281-1286, December, 2014.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy.** 2ª Ed. Abingdon, Oxon: Garland Science/BioScientific, 2005, p 103-117.

INOUE, I.; SHIBATA, S.; FUKATA, T. Efficacy of fosfomycin on Escherichia coli isolated from bitches with pyometra. **Journal of Veterinary Medical Science,** Japan, v. 75, n. 5, p. 657-658, 2013.

JENA, B.; RAO, K. S.; REDDY, K. C. S.; RAGHAVAN, K. B. P. Comparative efficacy of various therapeutic protocols in the treatment of pyometra in bitches. **Veterinarni Medicina,** v. 58, n. 5, p. 271-6, 2013.

JITPEAN, S.; HOLST, B. S.; EMANUELSON, U.; HÖGLUND, O. V.; PETTERSSON, A.; BULL, C. A.; HAGMAN, R. Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 1-12, January, 2014.

JITPEAN, S.; AMBROSEN, A.; EMANUELSON, U.; HAGMAN, R. Closed cervix is associated with more severe illness in dogs with pyometra. **BMC veterinary research,** v. 13, n. 1, p. 1-7, January, 2017.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V.; OLSON, P. S. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia:Saunders, 2001, p. 592.

JURKA, P.; MAX, A.; HAWRYŃSKA, K.; SNOCHOWSKI, M. Age-Related Pregnancy Results and Further Examination of Bitches after Aglepristone Treatment of Pyometra. **Reproduction in domestic animals,** v. 45, n. 3, p. 525-529, May, 2010.

JURKA, P.; DĄBROWSKA, L. S.; BORKOWSKA, J.; WINNICKA, A. Lack of in vitro effect of aglepristone on IFN-γ and IL-4 production by resting and mitogen-activated T cells of luteal bitches. **BMC veterinary research**, v. 9, n. 1, p. 1-8, October, 2013.

KAYMAZ, M.; BAŞTAN, A.; ERÜNAL, N.; ASLAN, S.; FINDIK, M. The use of laboratory findings in the diagnosis of CEH-pyometra complex in the bitch. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,** Turkey, v. 23, n. 2, p. 127-133, September, 1999.

KÜPLÜLÜ, S.; VURAL, M. R.; DEMIREL, A.; POLAT, M.; AKÇAY, A . The comparative evaluation of serum biochemical, haematological, bacteriological and clinical findings of dead and recovered bitches with pyometra in the postoperative process. **Acta veterinária,** v. 59, n. 2-3, p. 193-204, 2009.

LINHARATTANARUKSA, P. SRISUWATANASAGUL, S.; PONGLOWHAPAN, S.; KHALID, M.; CHATDARONG, K. Collagen and glycosaminoglycan profiles in the canine cervix during different stages of the estrous cycle and in open-and closed-cervix pyometra. **Journal of Veterinary Medical Science,** v. 76, n. 2, p. 197-203, March, 2013.

MADDENS, B.; DAMINET, S.; SMETS, P.; MEYER, E. Escherichia coli pyometra induces transient glomerular and tubular dysfunction in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 24, n. 6, p. 1263-1270, October, 2010.

MALIQUEO, M.; ECHIBURÚ, B.; CRISOSTO, N. Sex steroids modulate uterine-placental vasculature: implications for obstetrics and neonatal outcomes. **Frontiers in physiology**, v. 7, p. 152, April, 2016.

MOLINARI, C.; BATTAGLIA, A.; GROSSINI, E.; MARY, D. A. S. G.; SURICO, N.; VACCA, G. Effect of progesterone on peripheral blood flow in prepubertal female anesthetized pigs. **Journal of vascular research,** v. 38, n. 6, p. 569-577, December, 2001.

MURPHY, L. J.; GHAHARY, A. Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferation. **Endocrine Reviews,** USA, v. 11, n. 3, p. 443-453, 1990.

NAKANO, J.; COLE, B. Effects of prostaglandins E1 and F2-alpha on systemic, pulmonary, and splanchnic circulations in dogs. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 217, n. 1, p. 222-227, July, 1969.

NOVY, M. J.; PIASECKI, G.; JACKSON, B. T. Effect of prostaglandins E2 and F2α on umbilical blood flow and fetal hemodynamics. **Prostaglandins**, v. 5, n. 6, p. 543-555, March, 1974.

PATIL, A. R.; SWAMY, M.; CHANDRA, A.; JAWRE, S. Clinico-haematological and serum biochemical alterations in pyometra affected bitches. **African Journal of Biotechnology,** v. 12, n. 13, 2013.

PRASAD, V. D.; KUMAR, P. R.; SREENU, M. Pyometra in bitches: a review of literature. **Research & Reviews: Journal of Veterinary Science and Technology**, v. 6, n. 2, p. 12-20, 20187.

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

QUAN, S. F.; MOON, M. A.; LEMEN, R. J. Effects of arachidonic acid, PGF2 alpha, and a PGH2 analogue on airway diameters in dogs. **Journal of Applied Physiology**, v. 53, n. 4, p. 1005-1014, 1982.

REUSCHE, N.; BEINEKE, A.; URHAUSEN, C.; BEYERBACH, M.; SCHMICKE, M.; KRAMER, S.; GÜNZEL-APEL, A. R. Proliferative and apoptotic changes in the healthy canine endometrium and in cystic endometrial hyperplasia. **Theriogenology,** v. 114, p. 14-24, March, 2018.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology,** v. 31, n. 5, p. 986-1000, May, 2011.

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

SANT'ANNA, M. C.; MARTINS, G. F.; FLAIBAN, K. K. M. C.; TRATWEIN, L. G. C.; MARTINS, M. I. M. Protein-to-creatinine urinary in the early diagnosis of renal injury in canine pyometra. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** Brasil, v. 39, n. 3, p. 186-191, 2019.

SHAH, S. A.; SOOD, N. K.; WANI, B. M.; RATHER, M. A.; BEIGH, A. B.; AMIN, U. Haemato-biochemical studies in canine pyometra. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry,** v. 6, n. 4, p. 14-17, June, 2017.

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

SINGH, L. K.; PATRA, M. K.; MISHRA, G. K.; SINGH, V.; UPMANYU, V.; SAXENA, A. C.; SINGH, S. K.; DAS, G. K.; KUMAR, H.; KRISHNASWAMY, N. Endometrial transcripts of proinflammatory cytokine and enzymes in prostaglandin synthesis are upregulated in the bitches with atrophic pyometra. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 205, p. 65-71, November, 2018.

SUGIURA, K.; NISHIKAWA, M.; ISHIGURO, K.; TAJIMA, T.; INABA, M.; TORII, R.; HATOYA, S.; WIJEWARDANA, V.; KUMAGAI, D.; TAMADA, H.; SAWADA, T.; IKEHARA, S.; INABA, T. Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. **Immunobiology**, v. 209, n. 8, p. 619-627, September, 2004.

SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie,** v. 26, n. 1, p. 57-60, 1970.

SMITH, F. O. Canine pyometra. **Theriogenology**. v. 66, n. 3, p. 610-612, August 2006.

SORRIBAS, C. E. **Manual de emergências e afecções frequentes do aparelho reprodutor em cães.** São Paulo: Medvet, 2009, p. 136.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Fundamentos de patologia clínica veterinária. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap**, v. 8, p. 760, 2011.

TAKASAKI, A.; TAMURA, H.; MIWA, I.; TAKETANI, T.; SHIMAMURA, K.; SUGINO, N. Endometrial growth and uterine blood flow: a pilot study for improving endometrial thickness in the patients with a thin endometrium. **Fertility and sterility**, v. 93, n. 6, p. 1851-1858, April, 2010.

TAMADA, H.; KAWATA, N.; KAWATE, N.; INABA, T.; KIDA, K.; HATOYA, S.; AKUNE, A.; NAKAMA, K.; KOHSAKA, T.; TAKAHASHI, M.; SAWADA, T. Factors associated with patency of the uterine cervix in bitches with pyometra. **Research in veterinary Science,** v. 93, n. 3, p. 1203-1210, December, 2012.

TAMADA, H.; ADACHI, N.; KAWATE, N.; INABA, T.; HATOYA, S.; SAWADA, T. Positive correlation between patency and mRNA levels for cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in the uterine cervix of bitches with pyometra. **Journal of Veterinary Medical Science**, Japan, v. 78, n. 3, p. 525-528, 2016.

TRASCH, K.; WEHREND, A.; BOSTEDT, H. Follow-up examinations of bitches after conservative treatment of pyometra with the antigestagen aglepristone. **Journal of Veterinary Medicine Series A,** Berlin, v. 50, n. 7, p. 375-379, September, 2003.

UÇMAK, M.; TEK, Ç. Comparison of the efficacy of different methods on the medical treatment of cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in bitches. **Bull Vet Inst Pulawy**, v. 52, p. 231-234, 2008.

VEIGA, G. A. L.; MIZIARA, R. H.; ANGRIMANI, D. S. R.; REGAZZI, F. M.; SILVA, L. C. G.; LÚCIO, C. F.; VANNUCCHI, C. I. Abordagem diagnóstica e terapêutica das principais afecções uterinas em cadelas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias,** Portugal, v. 108, p. 9-16, 2013.

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

VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERSTEGEN-ONCLIN, K. Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. **Theriogenology,** v. 70, n. 3, p. 364-374, August, 2008.

VOLPATO, R.; MARTIN, I.; RAMOS, R. S.; TSUNEMI, M. H.; AMORIM, R. L.; LOPES, M. D. Imunoistoquímica de útero e cérvice de cadelas com diagnóstico de piometra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Brasil, v. 64, n. 5, p. 1109-1117, 2012.

WASSERMAN, M. A. Bronchopulmonary effects of prostaglandin F2α and three of its metabolites in the dog. **Prostaglandins**, v. 9, n. 6, p. 959-973, 1975a.

WASSERMAN, M. A. Bronchopulmonary responses to prostaglandin F2α, histamine and acetylcholine in the dog. **European journal of pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 146-155, 1975b.

WIJEWARDANA, V.; SUGIURA, K.; WIJESEKERA, D. P.; HATOYA, S.; NISHIMURA, T.; KANEGI, R.; USHIGUSA, T.; INABA, T. Effect of ovarian hormones on maturation of dendritic cells from peripheral blood monocytes in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science,** v. 77, n. 7, p. 771-775, February, 2015.

YOUNIS, M.; MOHAMMED, F. F.; ABU-SEIDA, A. M.; RAGAB, R. S.; GOHAR, H. M. Ultrasonography and pathological evaluation of cystic endometrial hyperplasia pyometra complex in bitches and queens with related ovarian alterations. **Global Veterinaria**, v. 13, n. 1, p. 60-67, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS DO GRUPO AGLEPRISTONE.

AREA	**AREA**	**PER**	**FR60**	**FR15**	**T60**	**FC0**	**FR0**	**T0**	**FC60**	**LEU**	**RI**	**T15**	**FC15**	**PI**	**ESCORE**	**SD**	**PT**	**PS**	**ED**	**HE**	**TAMAX**	**HT**
	1	0,98656	-0,69803	-0,69201	-0,67425	0,66502	-0,47234	-0,44038	0,40821	0,37645	-0,33906	-0,32194	0,31494	-0,3058	0,30162	-0,27289	0,27212	-0,16402	0,13962	-0,0843	0,06385	-0,06064
		<.0001	**0,0365**	**0,0266**	**0,0464**	**0,0359**	0,1681	0,2028	0,2754	0,1667	**0,0323**	0,3643	0,3754	0,055	0,0586	0,0884	0,3265	0,3119	0,3902	0,7652	0,6955	0,83
PER	**PER**	**AREA**	**FR60**	**FR15**	**T60**	**FC0**	**FR0**	**T0**	**LEU**	**RI**	**FC60**	**PI**	**ESCORE**	**T15**	**SD**	**PT**	**FC15**	**ED**	**PS**	**TAMAX**	**HE**	**HT**
	1	0,98656	-0,73476	-0,73104	-0,69589	0,6431	-0,47349	-0,47081	0,43293	-0,37091	0,36715	-0,34814	0,33616	-0,32796	-0,31602	0,29999	0,271	0,18716	-0,17887	0,09579	-0,04353	-0,02114
		<.0001	**0,0241**	**0,0163**	**0,0373**	**0,0449**	0,1669	0,1696	0,107	**0,0185**	0,3311	**0,0277**	**0,0339**	0,3549	**0,047**	0,2773	0,4488	0,2475	0,2695	0,5566	0,8776	0,9404
ESCORE	**ESCORE**	**PER**	**AREA**	**FR0**	**HT**	**HE**	**FR15**	**PT**	**RI**	**T15**	**SD**	**LEU**	**PS**	**PI**	**FC15**	**TAMAX**	**T0**	**ED**	**FC0**	**T60**	**FC60**	**FR60**
	1	0,33616	0,30162	0,26065	0,2575	0,23787	0,22466	0,22256	0,16793	0,16596	0,16592	0,16471	0,15417	0,12533	-0,06929	0,06631	0,04107	-0,02127	-0,01657	.	.	.
		0,0339	0,0586	0,467	0,3542	0,3933	0,5326	0,4253	0,3003	0,6468	0,3062	0,5575	0,3422	0,441	0,8491	0,6844	0,9103	0,8964	0,9638	.	.	.
HE	**HE**	**HT**	**FC60**	**T15**	**T60**	**PT**	**FC0**	**FC15**	**ED**	**TAMAX**	**ESCORE**	**T0**	**PS**	**FR60**	**FR0**	**LEU**	**FR15**	**SD**	**AREA**	**PER**	**PI**	**RI**
	1	0,98372	-0,68165	0,62831	0,50053	0,48848	-0,38057	-0,30725	0,2856	0,24171	0,23787	0,23719	0,19855	0,19244	0,12484	-0,10506	0,10097	-0,10095	-0,0843	-0,04353	0,01602	0,00502
		<.0001	0,205	0,2563	0,3904	0,0647	0,5274	0,615	0,3021	0,3854	0,3933	0,7009	0,4781	0,7565	0,8415	0,7094	0,8717	0,7204	0,7652	0,8776	0,9548	0,9858
HT	**HT**	**HE**	**FC60**	**T15**	**T60**	**FC0**	**PT**	**FC15**	**ED**	**T0**	**FR60**	**ESCORE**	**TAMAX**	**FR0**	**FR15**	**SD**	**PS**	**LEU**	**RI**	**AREA**	**PI**	**PER**
	1	0,98372	-0,7931	0,6863	0,59375	-0,52772	0,51087	-0,41945	0,31245	0,27953	0,26963	0,2575	0,23886	0,20093	0,17094	-0,16891	0,15283	-0,07098	-0,06679	-0,06064	-0,05828	-0,02114
		<.0001	0,1094	0,2007	0,2911	0,3607	0,0516	0,482	0,2569	0,6488	0,6609	0,3542	0,3912	0,7459	0,7834	0,5473	0,5866	0,8015	0,813	0,83	0,8365	0,9404
LEU	**LEU**	**T15**	**T60**	**T0**	**RI**	**PI**	**SD**	**PT**	**ED**	**PER**	**PS**	**AREA**	**FC15**	**TAMAX**	**ESCORE**	**FC60**	**FR0**	**HE**	**HT**	**FR60**	**FC0**	**FR15**
	1	-0,82617	-0,81893	-0,76864	-0,76726	-0,74126	-0,67393	0,54422	0,43836	0,43293	-0,4061	0,37645	0,3231	0,21803	0,16471	0,15595	0,1299	-0,10506	-0,07098	-0,06935	0,02503	0,00461
		0,0847	0,0899	0,1289	**0,0008**	**0,0016**	**0,0059**	**0,036**	0,1022	0,107	0,1331	0,1667	0,5959	0,435	0,5575	0,8022	0,8351	0,7094	0,8015	0,9118	0,9681	0,9941
PT	**PT**	**T0**	**T60**	**T15**	**LEU**	**HT**	**HE**	**FR60**	**FR15**	**PS**	**SD**	**RI**	**PER**	**PI**	**AREA**	**FR0**	**ESCORE**	**FC15**	**FC60**	**FC0**	**TAMAX**	**ED**
	1	-0,92626	-0,73111	-0,69224	0,54422	0,51087	0,48848	-0,42179	-0,40065	-0,38802	-0,32103	-0,31625	0,29999	-0,29174	0,27212	-0,24861	0,22256	-0,1597	-0,14462	-0,13061	-0,11349	0,03871
		0,0238	0,1605	0,1952	**0,036**	0,0516	0,0647	0,4793	0,5039	0,153	0,2433	0,2508	0,2773	0,2914	0,3265	0,6868	0,4253	0,7975	0,8165	0,8342	0,6872	0,891
FC0	**FC0**	**FC60**	**FC15**	**AREA**	**PER**	**HT**	**TAMAX**	**PS**	**SD**	**HE**	**PI**	**RI**	**T0**	**FR60**	**FR0**	**FR15**	**PT**	**T15**	**T60**	**ED**	**LEU**	**ESCORE**
	1	0,87772	0,76984	0,66502	0,6431	-0,52772	0,49841	0,47652	0,43635	-0,38057	0,25588	0,23573	0,22052	-0,21319	-0,21241	-0,17069	-0,13061	0,11032	-0,09894	0,09513	0,02503	-0,01657
		0,0019	**0,0092**	**0,0359**	**0,0449**	0,3607	0,1426	0,1638	0,2074	0,5274	0,4755	0,5121	0,5404	0,5818	0,5558	0,6373	0,8342	0,7616	0,8001	0,7938	0,9681	0,9638
FC15	**FC15**	**FC60**	**FC0**	**TAMAX**	**ED**	**PS**	**HT**	**T0**	**FR15**	**FR60**	**LEU**	**AREA**	**HE**	**PER**	**FR0**	**PT**	**T15**	**SD**	**T60**	**ESCORE**	**PI**	**RI**
	1	0,84251	0,76984	0,6966	0,5123	0,45109	-0,41945	0,40246	0,37264	0,3533	0,3231	0,31494	-0,30725	0,271	0,23509	-0,1597	0,11707	0,10761	0,09875	-0,06929	-0,05882	0,0184
		0,0044	**0,0092**	**0,0252**	0,13	0,1907	0,482	0,2489	0,2889	0,351	0,5959	0,3754	0,615	0,4488	0,5132	0,7975	0,7474	0,7673	0,8005	0,8491	0,8718	0,9598
FC60	**FC60**	**FC0**	**FC15**	**HT**	**HE**	**TAMAX**	**PS**	**AREA**	**PER**	**T0**	**SD**	**ED**	**LEU**	**PT**	**RI**	**FR15**	**FR0**	**FR60**	**PI**	**T15**	**T60**	**ESCORE**
	1	0,87772	0,84251	-0,7931	-0,68165	0,49224	0,4274	0,40821	0,36715	0,3041	0,25218	0,24149	0,15595	-0,14462	0,13688	0,10684	-0,08235	0,03767	0,03746	-0,0306	-0,00497	.
		0,0019	**0,0044**	0,1094	0,205	0,1783	0,2512	0,2754	0,3311	0,4263	0,5127	0,5313	0,8022	0,8165	0,7255	0,7844	0,8332	0,9233	0,9238	0,9377	0,9899	.
FR0	**FR0**	**FR60**	**FR15**	**ED**	**PER**	**AREA**	**T0**	**TAMAX**	**T15**	**T60**	**ESCORE**	**PT**	**SD**	**FC15**	**PI**	**FC0**	**HT**	**PS**	**LEU**	**HE**	**FC60**	**RI**
	1	0,75642	0,7368	0,60898	-0,47349	-0,47234	0,46949	0,43514	0,4265	0,4243	0,26065	-0,24861	-0,24565	0,23509	-0,21397	-0,21241	0,20093	0,13322	0,1299	0,12484	-0,08235	-0,04281
		0,0183	0,0151	0,0617	0,1669	0,1681	0,171	0,2088	0,219	0,255	0,467	0,6868	0,4939	0,5132	0,5528	0,5558	0,7459	0,7137	0,8351	0,8415	0,8332	0,9065
FR15	**FR15**	**FR60**	**ED**	**FR0**	**PER**	**T0**	**T60**	**AREA**	**TAMAX**	**T15**	**PT**	**PS**	**FC15**	**ESCORE**	**HT**	**FC0**	**FC60**	**SD**	**HE**	**RI**	**PI**	**LEU**
	1	0,99399	0,74825	0,7368	-0,73104	0,72018	0,71437	-0,69201	0,6018	0,44409	-0,40065	0,37717	0,37264	0,22466	0,17094	-0,17069	0,10684	-0,10126	0,10097	0,08241	-0,07845	0,00461
		<.0001	**0,0128**	**0,0151**	**0,0163**	**0,0188**	**0,0306**	**0,0266**	0,0657	0,1985	0,5039	0,2826	0,2889	0,5326	0,7834	0,6373	0,7844	0,7807	0,8717	0,8209	0,8295	0,9941
FR60	**FR60**	**FR15**	**ED**	**FR0**	**T60**	**T0**	**PER**	**AREA**	**TAMAX**	**T15**	**PT**	**FC15**	**PI**	**SD**	**PS**	**HT**	**FC0**	**HE**	**RI**	**LEU**	**FC60**	**ESCORE**
	1	0,99399	0,8538	0,75642	0,74679	0,74177	-0,73476	-0,69803	0,59996	0,48655	-0,42179	0,3533	-0,33973	-0,31462	0,31457	0,26963	-0,21319	0,19244	-0,17274	-0,06935	0,03767	.
		<.0001	**0,0034**	**0,0183**	**0,0208**	**0,0221**	**0,0241**	**0,0365**	0,0877	0,1841	0,4793	0,351	0,3711	0,4096	0,4097	0,6609	0,5818	0,7565	0,6567	0,9118	0,9233	.
T0	**T0**	**T60**	**PT**	**T15**	**ED**	**TAMAX**	**LEU**	**FR60**	**FR15**	**PS**	**PER**	**FR0**	**AREA**	**FC15**	**FC60**	**HT**	**HE**	**FC0**	**RI**	**SD**	**PI**	**ESCORE**
	1	0,92755	-0,92626	0,82755	0,79018	0,78857	-0,76864	0,74177	0,72018	0,57245	-0,47081	0,46949	-0,44038	0,40246	0,3041	0,27953	0,23719	0,22052	0,1825	0,16318	0,11519	0,04107
		0,0003	**0,0238**	**0,0031**	**0,0065**	**0,0067**	0,1289	**0,0221**	**0,0188**	0,0837	0,1696	0,171	0,2028	0,2489	0,4263	0,6488	0,7009	0,5404	0,6138	0,6524	0,7513	0,9103
T15	**T15**	**T60**	**T0**	**LEU**	**PT**	**HT**	**TAMAX**	**HE**	**PS**	**ED**	**FR60**	**FR15**	**FR0**	**RI**	**SD**	**PI**	**PER**	**AREA**	**ESCORE**	**FC15**	**FC0**	**FC60**
	1	0,84873	0,82755	-0,82617	-0,69224	0,6863	0,66118	0,62831	0,58444	0,569	0,48655	0,44409	0,4265	0,36456	0,36443	0,35313	-0,32796	-0,32194	0,16596	0,11707	0,11032	-0,0306
		0,0038	**0,0031**	0,0847	0,1952	0,2007	**0,0374**	0,2563	0,076	0,086	0,1841	0,1985	0,219	0,3003	0,3005	0,3169	0,3549	0,3643	0,6468	0,7474	0,7616	0,9377
T60	**T60**	**T0**	**T15**	**LEU**	**ED**	**FR60**	**PT**	**FR15**	**PER**	**AREA**	**TAMAX**	**HT**	**HE**	**PS**	**FR0**	**RI**	**FC0**	**FC15**	**PI**	**SD**	**FC60**	**ESCORE**
	1	0,92755	0,84873	-0,81893	0,75616	0,74679	-0,73111	0,71437	-0,69589	-0,67425	0,60934	0,59375	0,50053	0,47877	0,4243	0,19181	-0,09894	0,09875	0,09756	0,07455	-0,00497	.
		0,0003	**0,0038**	0,0899	**0,0184**	**0,0208**	0,1605	**0,0306**	**0,0373**	**0,0464**	0,0815	0,2911	0,3904	0,1923	0,255	0,621	0,8001	0,8005	0,8028	0,8488	0,9899	.
PS	**PS**	**TAMAX**	**RI**	**T15**	**T0**	**SD**	**PI**	**T60**	**FC0**	**FC15**	**FC60**	**LEU**	**PT**	**FR15**	**FR60**	**ED**	**HE**	**PER**	**AREA**	**ESCORE**	**HT**	**FR0**
	1	0,63833	0,58608	0,58444	0,57245	0,53737	0,52261	0,47877	0,47652	0,45109	0,4274	-0,4061	-0,38802	0,37717	0,31457	0,28142	0,19855	-0,17887	-0,16402	0,15417	0,15283	0,13322
		<.0001	**<.0001**	0,076	0,0837	**0,0003**	**0,0005**	0,1923	0,1638	0,1907	0,2512	0,1331	0,153	0,2826	0,4097	0,0785	0,4781	0,2695	0,3119	0,3422	0,5866	0,7137
ED	**ED**	**TAMAX**	**FR60**	**T0**	**T60**	**FR15**	**PI**	**SD**	**FR0**	**T15**	**RI**	**FC15**	**LEU**	**HT**	**HE**	**PS**	**FC60**	**PER**	**AREA**	**FC0**	**PT**	**ESCORE**
	1	0,88972	0,8538	0,79018	0,75616	0,74825	-0,6234	-0,61803	0,60898	0,569	-0,56426	0,5123	0,43836	0,31245	0,2856	0,28142	0,24149	0,18716	0,13962	0,09513	0,03871	-0,02127
		<.0001	**0,0034**	**0,0065**	**0,0184**	**0,0128**	**<.0001**	**<.0001**	0,0617	0,086	**0,0001**	0,13	0,1022	0,2569	0,3021	0,0785	0,5313	0,2475	0,3902	0,7938	0,891	0,8964
TAMAX	**TAMAX**	**ED**	**T0**	**FC15**	**T15**	**PS**	**T60**	**FR15**	**FR60**	**FC0**	**FC60**	**FR0**	**PI**	**SD**	**HE**	**HT**	**LEU**	**RI**	**PT**	**PER**	**ESCORE**	**AREA**
	1	0,88972	0,78857	0,6966	0,66118	0,63833	0,60934	0,6018	0,59996	0,49841	0,49224	0,43514	-0,29518	-0,24529	0,24171	0,23886	0,21803	-0,20214	-0,11349	0,09579	0,06631	0,06385
		<.0001	**0,0067**	**0,0252**	**0,0374**	**<.0001**	0,0815	0,0657	0,0877	0,1426	0,1783	0,2088	0,0644	0,1271	0,3854	0,3912	0,435	0,211	0,6872	0,5566	0,6844	0,6955
PI	**PI**	**SD**	**RI**	**LEU**	**ED**	**PS**	**T15**	**PER**	**FR60**	**AREA**	**TAMAX**	**PT**	**FC0**	**FR0**	**ESCORE**	**T0**	**T60**	**FR15**	**FC15**	**HT**	**FC60**	**HE**
	1	0,97506	0,97015	-0,74126	-0,6234	0,52261	0,35313	-0,34814	-0,33973	-0,3058	-0,29518	-0,29174	0,25588	-0,21397	0,12533	0,11519	0,09756	-0,07845	-0,05882	-0,05828	0,03746	0,01602
		<.0001	**<.0001**	**0,0016**	**<.0001**	**0,0005**	0,3169	**0,0277**	0,3711	0,055	0,0644	0,2914	0,4755	0,5528	0,441	0,7513	0,8028	0,8295	0,8718	0,8365	0,9238	0,9548
RI	**RI**	**PI**	**SD**	**LEU**	**PS**	**ED**	**PER**	**T15**	**AREA**	**PT**	**FC0**	**TAMAX**	**T60**	**T0**	**FR60**	**ESCORE**	**FC60**	**FR15**	**HT**	**FR0**	**FC15**	**HE**
	1	0,97015	0,9512	-0,76726	0,58608	-0,56426	-0,37091	0,36456	-0,33906	-0,31625	0,23573	-0,20214	0,19181	0,1825	-0,17274	0,16793	0,13688	0,08241	-0,06679	-0,04281	0,0184	0,00502
		<.0001	**<.0001**	**0,0008**	**<.0001**	**0,0001**	**0,0185**	0,3003	**0,0323**	0,2508	0,5121	0,211	0,621	0,6138	0,6567	0,3003	0,7255	0,8209	0,813	0,9065	0,9598	0,9858
SD	**SD**	**PI**	**RI**	**LEU**	**ED**	**PS**	**FC0**	**T15**	**PT**	**PER**	**FR60**	**AREA**	**FC60**	**FR0**	**TAMAX**	**HT**	**ESCORE**	**T0**	**FC15**	**FR15**	**HE**	**T60**
	1	0,97506	0,9512	-0,67393	-0,61803	0,53737	0,43635	0,36443	-0,32103	-0,31602	-0,31462	-0,27289	0,25218	-0,24565	-0,24529	-0,16891	0,16592	0,16318	0,10761	-0,10126	-0,10095	0,07455
		<.0001	**<.0001**	**0,0059**	**<.0001**	**0,0003**	0,2074	0,3005	0,2433	**0,047**	0,4096	0,0884	0,5127	0,4939	0,1271	0,5473	0,3062	0,6524	0,7673	0,7807	0,7204	0,8488

APÊNDICE B – ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS DO GRUPO ASSOCIAÇÃO.

AREA	**AREA**	**PER**	**HE**	**HT**	**T60**	**T15**	**RI**	**FR60**	**PI**	**SD**	**FC15**	**LEU**	**T0**	**ED**	**FR0**	**FR15**	**FC60**	**TAMAX**	**ESCORE**	**PT**	**FC0**	**PS**
	1	0,9752	0,80268	0,80231	0,58816	0,57053	-0,54303	0,49353	-0,48162	-0,44175	-0,38381	0,36983	0,367	0,33159	-0,31636	-0,29338	-0,25379	0,2489	0,24131	-0,18369	-0,06927	-0,06278
		<.0001	**0,0005**	**0,0006**	0,0957	0,1087	**0,0003**	0,177	**0,0017**	**0,0043**	0,3078	0,1931	0,3313	**0,0366**	0,4069	0,4436	0,5099	0,1214	0,1336	0,548	0,8595	0,7003
PER	**PER**	**AREA**	**HE**	**HT**	**T60**	**T15**	**RI**	**PI**	**T0**	**SD**	**FR60**	**ED**	**LEU**	**FR15**	**FC15**	**PT**	**TAMAX**	**FC60**	**FR0**	**ESCORE**	**FC0**	**PS**
	1	0,9752	0,76516	0,74096	0,68288	0,65922	-0,56215	-0,49756	0,46563	-0,45991	0,44716	0,36449	0,34803	-0,31348	-0,28805	-0,28204	0,27678	-0,25782	-0,23337	0,21028	0,06926	-0,04143
		<.0001	**0,0014**	**0,0024**	**0,0426**	0,0534	**0,0002**	**0,0011**	0,2065	**0,0028**	0,2275	**0,0208**	0,2227	0,4114	0,4523	0,3505	0,0838	0,503	0,5456	0,1928	0,8595	0,7996
ESCORE	**ESCORE**	**LEU**	**SD**	**RI**	**PI**	**ED**	**TAMAX**	**HT**	**AREA**	**HE**	**PER**	**PT**	**PS**	**T60**	**FC0**	**T15**	**T0**	**FR60**	**FR15**	**FR0**	**FC60**	**FC15**
	1	0,45306	-0,43124	-0,41561	-0,37185	0,34603	0,26386	0,26048	0,24131	0,21359	0,21028	0,15717	0,08713	.	.	.	.	.	.	.	.	.
		0,1038	**0,0055**	**0,0077**	**0,0181**	**0,0287**	0,0999	0,3684	0,1336	0,4634	0,1928	0,6081	0,5929	.	.	.	.	.	.	.	.	.
HE	**HE**	**FR15**	**HT**	**FC15**	**AREA**	**PER**	**T0**	**FC60**	**FR60**	**FC0**	**RI**	**FR0**	**SD**	**PI**	**PS**	**ESCORE**	**PT**	**TAMAX**	**ED**	**LEU**	**T15**	**T60**
	1	-0,94734	0,93619	-0,87956	0,80268	0,76516	-0,72448	-0,71106	-0,62258	-0,61498	-0,44287	-0,38253	-0,29811	-0,28494	-0,26916	0,21359	-0,16505	-0,09642	0,07833	0,07814	0,02678	0,00634
		0,0527	**<.0001**	0,1204	**0,0005**	**0,0014**	0,2755	0,2889	0,3774	0,385	0,1128	0,6175	0,3006	0,3234	0,3521	0,4634	0,59	0,743	0,7901	0,7906	0,9732	0,9937
HT	**HT**	**FR15**	**HE**	**T0**	**AREA**	**FC15**	**FC0**	**FR60**	**PER**	**FC60**	**RI**	**FR0**	**PS**	**PI**	**ESCORE**	**SD**	**T60**	**T15**	**TAMAX**	**PT**	**LEU**	**ED**
	1	-0,94903	0,93619	-0,8736	0,80231	-0,78486	-0,75354	-0,7428	0,74096	-0,59886	-0,45804	-0,43946	-0,404	-0,27102	0,26048	-0,25048	-0,24822	-0,22711	-0,16557	-0,08822	0,0637	0,02734
		0,051	**<.0001**	0,1264	**0,0006**	0,2151	0,2465	0,2572	0,0024	0,4011	0,0996	0,5605	0,152	0,3486	0,3684	0,3877	0,7518	0,7729	0,5716	0,7744	0,8287	0,9261
LEU	**LEU**	**T15**	**T60**	**PI**	**RI**	**SD**	**ED**	**TAMAX**	**PS**	**ESCORE**	**FC0**	**FC15**	**FR60**	**FC60**	**AREA**	**FR0**	**PER**	**T0**	**FR15**	**HE**	**HT**	**PT**
	1	-0,91111	-0,89844	-0,85046	-0,8411	-0,82813	0,80989	0,75715	0,49876	0,45306	-0,43963	0,43775	-0,39945	0,37686	0,36983	-0,36726	0,34803	-0,32991	0,17546	0,07814	0,0637	-0,02635
		0,0889	0,1016	**0,0001**	**0,0002**	**0,0003**	**0,0004**	**0,0017**	0,0695	0,1038	0,5604	0,5622	0,6005	0,6231	0,1931	0,6327	0,2227	0,6701	0,8245	0,7906	0,8287	0,9319
PT	**PT**	**FR0**	**FC60**	**FC15**	**FR60**	**PER**	**SD**	**FC0**	**PI**	**AREA**	**HE**	**RI**	**ESCORE**	**T0**	**T60**	**ED**	**FR15**	**T15**	**HT**	**TAMAX**	**LEU**	**PS**
	1	-0,7082	-0,59133	-0,34362	-0,28877	-0,28204	0,2377	-0,20382	0,19597	-0,18369	-0,16505	0,15769	0,15717	0,15026	0,13169	-0,12042	-0,11706	0,10198	-0,08822	-0,07201	-0,02635	0,01997
		0,2918	0,4087	0,6564	0,7112	0,3505	0,4342	0,7962	0,5211	0,548	0,59	0,6069	0,6081	0,8497	0,8683	0,6952	0,8829	0,898	0,7744	0,8152	0,9319	0,9484
FC0	**FC0**	**HT**	**T0**	**FC15**	**T60**	**HE**	**T15**	**FR15**	**LEU**	**PI**	**TAMAX**	**ED**	**FR0**	**RI**	**SD**	**PT**	**PS**	**FC60**	**AREA**	**PER**	**FR60**	**ESCORE**
	1	-0,75354	0,71559	0,65173	0,63388	-0,61498	0,60963	0,46244	-0,43963	-0,30132	0,29987	0,29857	0,28864	-0,25933	-0,25474	-0,20382	0,14179	0,1381	-0,06927	0,06926	-0,01517	.
		0,2465	**0,0302**	0,0572	0,0668	0,385	0,0813	0,2101	0,5604	0,4307	0,4331	0,4352	0,4513	0,5004	0,5083	0,7962	0,7159	0,7231	0,8595	0,8595	0,9691	.
FC15	**FC15**	**HE**	**HT**	**FC0**	**FR15**	**TAMAX**	**FC60**	**ED**	**PS**	**LEU**	**AREA**	**FR0**	**PT**	**PER**	**T0**	**RI**	**PI**	**FR60**	**T15**	**SD**	**T60**	**ESCORE**
	1	-0,87956	-0,78486	0,65173	0,6498	0,63998	0,63674	0,5873	0,53325	0,43775	-0,38381	0,35704	-0,34362	-0,28805	0,28234	-0,10979	-0,07509	-0,06087	-0,02271	-0,00726	0,0058	.
		0,1204	0,2151	0,0572	0,0582	0,0634	0,0652	0,0964	0,1393	0,5622	0,3078	0,3456	0,6564	0,4523	0,4617	0,7786	0,8477	0,8764	0,9537	0,9852	0,9882	.
FC60	**FC60**	**PS**	**TAMAX**	**ED**	**HE**	**FR15**	**FC15**	**HT**	**PT**	**FR0**	**LEU**	**FR60**	**PER**	**AREA**	**T60**	**T15**	**FC0**	**T0**	**PI**	**RI**	**SD**	**ESCORE**
	1	0,82364	0,78834	0,7516	-0,71106	0,67404	0,63674	-0,59886	-0,59133	0,46529	0,37686	0,31489	-0,25782	-0,25379	-0,23582	-0,2228	0,1381	0,13166	0,04148	-0,01721	-0,01572	.
		0,0064	**0,0116**	**0,0195**	0,2889	**0,0465**	0,0652	0,4011	0,4087	0,2069	0,6231	0,4092	0,503	0,5099	0,5413	0,5645	0,7231	0,7356	0,9156	0,9649	0,968	.
FR0	**FR0**	**PT**	**FR15**	**FC60**	**HT**	**PS**	**HE**	**LEU**	**FC15**	**TAMAX**	**AREA**	**FR60**	**ED**	**FC0**	**PER**	**SD**	**T0**	**RI**	**T15**	**PI**	**T60**	**ESCORE**
	1	-0,7082	0,53636	0,46529	-0,43946	0,41193	-0,38253	-0,36726	0,35704	0,33542	-0,31636	0,31099	0,30526	0,28864	-0,23337	-0,10025	-0,04158	0,03883	0,01874	0,0133	0,00317	.
		0,2918	0,1366	0,2069	0,5605	0,2706	0,6175	0,6327	0,3456	0,3776	0,4069	0,4153	0,4244	0,4513	0,5456	0,7975	0,9154	0,921	0,9618	0,9729	0,9935	.
FR15	**FR15**	**HT**	**HE**	**FC60**	**FC15**	**TAMAX**	**PS**	**ED**	**FR0**	**FR60**	**FC0**	**PER**	**AREA**	**T0**	**LEU**	**SD**	**PT**	**T15**	**T60**	**PI**	**RI**	**ESCORE**
	1	-0,94903	-0,94734	0,67404	0,6498	0,59227	0,58798	0,54664	0,53636	0,48719	0,46244	-0,31348	-0,29338	0,26963	0,17546	-0,12801	-0,11706	0,10031	0,09144	-0,06246	-0,0063	.
		0,051	0,0527	**0,0465**	0,0582	0,0929	0,0959	0,1278	0,1366	0,1835	0,2101	0,4114	0,4436	0,4829	0,8245	0,7428	0,8829	0,7974	0,815	0,8732	0,9872	.
FR60	**FR60**	**HT**	**HE**	**AREA**	**FR15**	**T15**	**PER**	**T60**	**LEU**	**T0**	**FC60**	**FR0**	**PT**	**PS**	**TAMAX**	**RI**	**ED**	**FC15**	**SD**	**PI**	**FC0**	**ESCORE**
	1	-0,7428	-0,62258	0,49353	0,48719	0,47734	0,44716	0,44608	-0,39945	0,33667	0,31489	0,31099	-0,28877	0,20165	0,17846	0,1459	0,09891	-0,06087	-0,04146	-0,01575	-0,01517	.
		0,2572	0,3774	0,177	0,1835	0,1938	0,2275	0,2288	0,6005	0,3757	0,4092	0,4153	0,7112	0,6029	0,646	0,708	0,8001	0,8764	0,9157	0,9679	0,9691	.
T0	**T0**	**HT**	**T60**	**T15**	**HE**	**FC0**	**PER**	**TAMAX**	**AREA**	**ED**	**PI**	**FR60**	**LEU**	**SD**	**FC15**	**FR15**	**RI**	**PS**	**PT**	**FC60**	**FR0**	**ESCORE**
	1	-0,8736	0,85117	0,83484	-0,72448	0,71559	0,46563	0,38985	0,367	0,36539	-0,3572	0,33667	-0,32991	-0,30354	0,28234	0,26963	-0,25675	0,22491	0,15026	0,13166	-0,04158	.
		0,1264	**0,0036**	**0,0051**	0,2755	**0,0302**	0,2065	0,2996	0,3313	0,3336	0,3453	0,3757	0,6701	0,4272	0,4617	0,4829	0,5048	0,5607	0,8497	0,7356	0,9154	.
T15	**T15**	**T60**	**LEU**	**T0**	**PER**	**FC0**	**AREA**	**FR60**	**HT**	**FC60**	**PI**	**PS**	**SD**	**ED**	**PT**	**FR15**	**TAMAX**	**RI**	**HE**	**FC15**	**FR0**	**ESCORE**
	1	0,99401	-0,91111	0,83484	0,65922	0,60963	0,57053	0,47734	-0,22711	-0,2228	-0,21124	-0,17707	-0,15299	-0,12688	0,10198	0,10031	-0,09231	-0,05734	0,02678	-0,02271	0,01874	.
		<.0001	0,0889	**0,0051**	0,0534	0,0813	0,1087	0,1938	0,7729	0,5645	0,5853	0,6486	0,6943	0,745	0,898	0,7974	0,8133	0,8835	0,9732	0,9537	0,9618	.
T60	**T60**	**T15**	**LEU**	**T0**	**PER**	**FC0**	**AREA**	**FR60**	**PI**	**HT**	**FC60**	**SD**	**PS**	**RI**	**PT**	**FR15**	**ED**	**TAMAX**	**HE**	**FC15**	**FR0**	**ESCORE**
	1	0,99401	-0,89844	0,85117	0,68288	0,63388	0,58816	0,44608	-0,30192	-0,24822	-0,23582	-0,23208	-0,19685	-0,14803	0,13169	0,09144	-0,07922	-0,05375	0,00634	0,0058	0,00317	.
		<.0001	0,1016	**0,0036**	**0,0426**	0,0668	0,0957	0,2288	0,4298	0,7518	0,5413	0,5479	0,6117	0,7039	0,8683	0,815	0,8395	0,8908	0,9937	0,9882	0,9935	.
PS	**PS**	**FC60**	**TAMAX**	**ED**	**FR15**	**FC15**	**LEU**	**FR0**	**HT**	**HE**	**T0**	**SD**	**FR60**	**T60**	**RI**	**T15**	**PI**	**FC0**	**ESCORE**	**AREA**	**PER**	**PT**
	1	0,82364	0,8151	0,71775	0,58798	0,53325	0,49876	0,41193	-0,404	-0,26916	0,22491	-0,21394	0,20165	-0,19685	-0,18679	-0,17707	-0,17346	0,14179	0,08713	-0,06278	-0,04143	0,01997
		0,0064	**<.0001**	**<.0001**	0,0959	0,1393	0,0695	0,2706	0,152	0,3521	0,5607	0,185	0,6029	0,6117	0,2485	0,6486	0,2844	0,7159	0,5929	0,7003	0,7996	0,9484
ED	**ED**	**TAMAX**	**LEU**	**RI**	**SD**	**PI**	**FC60**	**PS**	**FC15**	**FR15**	**T0**	**PER**	**ESCORE**	**AREA**	**FR0**	**FC0**	**T15**	**PT**	**FR60**	**T60**	**HE**	**HT**
	1	0,97345	0,80989	-0,79735	-0,75966	-0,7561	0,7516	0,71775	0,5873	0,54664	0,36539	0,36449	0,34603	0,33159	0,30526	0,29857	-0,12688	-0,12042	0,09891	-0,07922	0,07833	0,02734
		<.0001	**0,0004**	**<.0001**	**<.0001**	**<.0001**	**0,0195**	**<.0001**	0,0964	0,1278	0,3336	**0,0208**	**0,0287**	**0,0366**	0,4244	0,4352	0,745	0,6952	0,8001	0,8395	0,7901	0,9261
TAMAX	**TAMAX**	**ED**	**PS**	**FC60**	**LEU**	**RI**	**PI**	**SD**	**FC15**	**FR15**	**T0**	**FR0**	**FC0**	**PER**	**ESCORE**	**AREA**	**FR60**	**HT**	**HE**	**T15**	**PT**	**T60**
	1	0,97345	0,8151	0,78834	0,75715	-0,68343	-0,67325	-0,66888	0,63998	0,59227	0,38985	0,33542	0,29987	0,27678	0,26386	0,2489	0,17846	-0,16557	-0,09642	-0,09231	-0,07201	-0,05375
		<.0001	**<.0001**	**0,0116**	**0,0017**	**<.0001**	**<.0001**	**<.0001**	0,0634	0,0929	0,2996	0,3776	0,4331	0,0838	0,0999	0,1214	0,646	0,5716	0,743	0,8133	0,8152	0,8908
PI	**PI**	**SD**	**RI**	**LEU**	**ED**	**TAMAX**	**PER**	**AREA**	**ESCORE**	**T0**	**T60**	**FC0**	**HE**	**HT**	**T15**	**PT**	**PS**	**FC15**	**FR15**	**FC60**	**FR60**	**FR0**
	1	0,98035	0,957	-0,85046	-0,7561	-0,67325	-0,49756	-0,48162	-0,37185	-0,3572	-0,30192	-0,30132	-0,28494	-0,27102	-0,21124	0,19597	-0,17346	-0,07509	-0,06246	0,04148	-0,01575	0,0133
		<.0001	**<.0001**	**0,0001**	**<.0001**	**<.0001**	**0,0011**	**0,0017**	**0,0181**	0,3453	0,4298	0,4307	0,3234	0,3486	0,5853	0,5211	0,2844	0,8477	0,8732	0,9156	0,9679	0,9729
RI	**RI**	**PI**	**SD**	**LEU**	**ED**	**TAMAX**	**PER**	**AREA**	**HT**	**HE**	**ESCORE**	**FC0**	**T0**	**PS**	**PT**	**T60**	**FR60**	**FC15**	**T15**	**FR0**	**FC60**	**FR15**
	1	0,957	0,931	-0,8411	-0,79735	-0,68343	-0,56215	-0,54303	-0,45804	-0,44287	-0,41561	-0,25933	-0,25675	-0,18679	0,15769	-0,14803	0,1459	-0,10979	-0,05734	0,03883	-0,01721	-0,0063
		<.0001	**<.0001**	**0,0002**	**<.0001**	**<.0001**	**0,0002**	**0,0003**	0,0996	0,1128	**0,0077**	0,5004	0,5048	0,2485	0,6069	0,7039	0,708	0,7786	0,8835	0,921	0,9649	0,9872
SD	**SD**	**PI**	**RI**	**LEU**	**ED**	**TAMAX**	**PER**	**AREA**	**ESCORE**	**T0**	**HE**	**FC0**	**HT**	**PT**	**T60**	**PS**	**T15**	**FR15**	**FR0**	**FR60**	**FC60**	**FC15**
	1	0,98035	0,931	-0,82813	-0,75966	-0,66888	-0,45991	-0,44175	-0,43124	-0,30354	-0,29811	-0,25474	-0,25048	0,2377	-0,23208	-0,21394	-0,15299	-0,12801	-0,10025	-0,04146	-0,01572	-0,00726
		<.0001	**<.0001**	**0,0003**	**<.0001**	**<.0001**	**0,0028**	**0,0043**	**0,0055**	0,4272	0,3006	0,5083	0,3877	0,4342	0,5479	0,185	0,6943	0,7428	0,7975	0,9157	0,968	0,9852

ANEXOS

ANEXO A – TERAPIA DE SUPORTE PARA A PIOMETRA CANINA

- Enrofloxacina: 5 mg/Kg, BID, por via intravenosa, diluída em solução fisiológica, por 8 dias;
- Metronidazol: 15 mg/Kg, BID, por via intravenosa, por 8 dias;
- Solução fisiológica NaCl (0,9%);
- Ranitidina: 2 mg/Kg, BID, por via oral, por 8 dias;
- Ondansetrona: 0,2 mg/Kg, BID, por via oral, por 8 dias;
- Vitamina do complexo B: 1 ampola de 2 mL, SID, por via intravenosa;
- Vitamina C: 1 ampola de 2 mL, SID, por via intravenosa;
- Suplemento vitamínico Glicolpet®: 1 gota/5 Kg, BID, por via oral, por 8 dias;
- Suplemento vitamínico Hemolitan®: 1 mL/10 Kg, BID, por via oral;
- Cobavital®: 4 mg/animal, por via oral;
- Silimarina®: 23 mg/Kg, SID, por via oral.

ANEXO B – VALORES DE REFERÊNCIA ADOTADOS PELO SERVIÇO DE LABORATÓRIO CLÍNICO DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA DA FMVZ-USP.

VALORES DE REFERÊNCIA		
He	5,0 - 8,0	$x10^6$
Ht	37 - 57	%
Leucócitos	6.000 - 15.000	/µL
Protéina	5,3 - 7,6	g/dL