



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**PREVALÊNCIA DE ENDOMETRITE EM CADELAS
CLINICAMENTE SAUDÁVEIS**

Dissertação de Mestrado apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada por Professora Doutora Michelle Serafim e Professora Doutora Adriana Belas.

Gonçalo Silva Garcez Palha, nº 21700860

2024

www.ulusofona.pt



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**PREVALÊNCIA DE ENDOMETRITE EM CADELAS
CLINICAMENTE SAUDÁVEIS**

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, no dia 1/3/2024, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 728/2024, de 19 de fevereiro, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Mariana Batista

Arguente: Professora Doutora Ana Amaral
(Universidade de Lisboa)

Orientador: Professora Doutora Michelle Serafim

Este trabalho também foi orientado por Professora Doutora Adriana Belas e Doutor Paulo Borges.

Gonçalo Silva Garcez Palha, nº 21700860

2024

www.ulusofona.pt

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa, à Professora Doutora Laurentina Pedroso e a todos os docentes, por terem enriquecido a minha formação ao longo destes anos.

Aos meus orientadores, quero agradecer pela oportunidade de participar nesta investigação. À Professora Doutora Michelle Serafim, pela ajuda no delineamento do projeto e tê-lo tornado possível. À Professora Doutora Adriana Belas, agradeço não só todo o carinho, apoio e disponibilidade demonstrados, mas também os desafios e a confiança em todo o processo. Ao Professor Paulo Borges, por ter sido um mentor ao longo dos últimos dois anos, por ter fomentado o meu gosto por esta área e pelo empenho que teve na concretização deste estudo.

Aos restantes docentes que contribuíram para este projeto – a Professora Joana Fonseca, o Professor José Catarino, a Professora Doutora Margarida Alves e a Professora Doutora Ana Amaral – obrigado pela disponibilidade, ajuda e dedicação.

A toda a equipa do laboratório, obrigado pela simpatia e a ajuda dada.

À Dr.^a Sónia Fonseca, obrigado por ter disponibilizado as condições necessárias para a realização da investigação.

A toda a equipa do Anicura Atlântico Hospital Veterinário, obrigado por me terem acolhido, pelos momentos de boa disposição e por todo o conhecimento transmitido. Toda a experiência adquirida acompanhar-me-á ao longo do meu percurso profissional.

À Sara, Sílvia e Sofia, pelas dicas, amizade e alegria. Não só ajudaram na integração durante o estágio, como também foram essenciais para a conclusão do projeto.

A todos os meus amigos da faculdade, em particular o Brioso, César, Luís e Manel, que me aturam desde o início. Obrigado a todos pelas parvoíces e pelo percurso que fizemos em conjunto.

Aos mais antigos, Xico e André, obrigado por gozarem e serem gozados e desculparem os meus períodos ausentes.

À Raquel, obrigado por estares sempre ao meu lado, pelo teu otimismo contagiante e por todo o apoio e ajuda que sempre me deste.

Aos meus pais, deixo o meu maior agradecimento por todos os esforços que fizeram para investir na minha educação. Sofreram comigo, mas também celebraram efusivamente cada feito. Obrigado por acreditarem sempre e pela vossa ajuda incondicional.

Resumo

A endometrite é reconhecida como uma das principais causas de infertilidade na clínica de grandes animais. Em cadelas, parece ser desencadeada por um atraso na *clearance* uterina após a inseminação ou por infecções uterinas ascendentes durante o proestro e estro. Apesar de ser uma doença uterina prevalente, a informação disponível nesta espécie é, ainda, limitada.

Com o presente estudo, pretendeu-se determinar a prevalência de endometrite em cadelas clinicamente saudáveis, comparar os resultados obtidos por citologia e histopatologia do endométrio e avaliar a frequência e caracterização fenotípica da microbiota uterina. Para tal, foram incluídas 21 cadelas sem presença de tumor uterino nem conteúdo intrauterino (piómetra, mucómetra, hidrómetra e hematómetra), submetidas a ovariectomia ($n=17$) ou ovariosterectomia ($n=4$). A fase do ciclo éstrico foi determinada com recurso à data do último cio, ao intervalo entre cios, à citologia vaginal e à concentração sérica de progesterona. Por via transcervical, foram colhidas amostras para bacteriologia e citologia através de lavagem uterina, seguida de biópsias uterinas para bacteriologia e histopatologia. Nos isolados bacterianos obtidos foi realizada a suscetibilidade a antibióticos pelo método de difusão de disco e interpretada de acordo com os critérios *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

A população em estudo apresentava-se em anestro ($n=5$) e em proestro ($n=16$). Numa cadela não foi possível cateterizar o cérvix para a colheita das amostras. Em 65% ($n=13$) das biópsias uterinas foi identificado tecido endometrial sem infiltrado celular inflamatório. A citologia apresentou resultados indicativos de endometrite em 35% cadelas ($n=7$). Adicionalmente, 65% ($n=13$) das cadelas estiveram associadas a crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, das quais, quatro eram multirresistentes.

Os resultados histopatológicos sugerem que a endometrite não está presente em cadelas clinicamente saudáveis. Os resultados da citologia do fluido de lavagem uterina não foram concordantes com os de histopatologia. Estes últimos apresentaram limitações associadas à técnica de colheita por via transcervical, que parece não ser a mais adequada para o diagnóstico de endometrite em cadelas sem história de infertilidade. Uma vez que a maioria das cadelas (85%) não foi previamente inseminada, é possível que a endometrite em cadelas possa ser desencadeada pela cópula ou inseminação artificial. A cultura bacteriológica forneceu dados sobre a microbiota do endométrio, incluindo a presença de bactérias multirresistentes em cadelas sem história de antibioterapia.

Palavras-chave: endometrite; cadelas; lavagem uterina; microbiota; bactérias multirresistentes.

Abstract

Endometritis is recognized as one of the main causes of infertility in large animal clinics. In female dogs, it appears to be triggered by a delay in uterine clearance following insemination or by ascending uterine infections during proestrus and estrus. Despite being a prevalent uterine disease, with an impact on fertility, information concerning the subject in this species remains limited.

This study aimed to determine the prevalence of endometritis in clinically healthy female dogs, compare findings between endometrial cytology and histopathology, and assess both the frequency and phenotypic characterization of the uterine microbiota. A total of 21 female dogs were included, without uterine tumor nor intrauterine content (pyometra, mucometra, hydrometra and hematometra), which underwent ovariectomy ($n=17$) or ovariohysterectomy ($n=4$). Estrous cycle phase was determined based on the last heat, inter-heat intervals, vaginal cytology, and serum progesterone concentration. Transcervically, samples were collected for bacteriology and cytology through uterine lavage, followed by uterine biopsies for bacteriology and histopathology. Antibiotic susceptibility of the isolates was determined through the disk diffusion method and interpreted following the Clinical and Laboratory Standards Institute criteria.

The study population was presented in anestrus ($n=5$) and proestrus ($n=16$). In one case, catheterization of the cervix for sample collection was not feasible. Endometrial tissue was identified in 65% ($n=13$) of the uterine biopsies, showing no infiltration of inflammatory cells. Cytological analysis indicated evidence of endometritis in 35% ($n=7$) of female dogs. Furthermore, 65% ($n=13$) of the female dogs exhibited the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria, four of which were multidrug-resistant.

Histopathological findings suggest that endometritis is not present in clinically healthy female dogs. The uterine lavage fluid cytology findings were not in agreement with the histopathology results. The latter presented limitations related to the transcervical sample technique, which does not seem to be the most suitable for diagnosing endometritis in female dogs without a history of infertility. Since most female dogs (85%) have not been previously inseminated, it is possible that endometritis in this species can be triggered by natural or artificial insemination. Bacteriological culture provided data on the endometrial microbiota, including the presence of multi-resistant bacteria in female dogs with no history of antibiotic therapy.

Keywords: endometritis; female dogs; uterine lavage; microbiota; multidrug-resistant bacteria.

Lista de abreviaturas, sigas e símbolos

AINES – Anti-inflamatórios não esteróides

BARF – *Biologically appropriate raw food*

BHIB – *Brain Heart Broth*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio-padrão

Et al. – E outros, da locução latina “*et alii*”

FSH – Hormona folículo-estimulante

G – Gauge

GnRH – Hormona libertadora de gonadotrofinas

H&E – Hematoxilina-eosina

IA – Inseminação artificial

IM – Via intramuscular

IV – Via intravenosa

LH – Hormona luteinizante

LR – Lactato de ringer

MDR – Multirresistentes

MII – Metafase II

NaCl – Cloreto de sódio

OVE – Ovariectomia

OVH – Ovariohisterectomia

p.e – Por exemplo

p.ov – Após a ovulação

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PGF2 α – Prostaglandina F2alfa

pré-ov – Pré-ovulatório

TBE – Tris-borato-EDTA

TSA – Teste de suscetibilidade aos antibióticos

μL – Microlitro

μM – Micrómetro

cm – Centímetro

Kg – Quilograma

mg – Miligrama

ml – Mililitro

mm – Milímetro

°C – Grau Celsius

pb – Pares de bases

rpm – Rotações por minuto

s – Segundos

UFC – Unidade Formadora de Colónias

μg – Micrograma

≈ – Aproximadamente

≥ – Maior ou igual

% – Percentagem

± – Mais ou menos

Índice Geral

1. Casuística do estágio.....	13
2. Introdução.....	16
2.1. Ciclo éstrico.....	17
2.1.1. Proestro.....	17
2.1.2. Estro.....	17
2.1.3. Diestro.....	18
2.1.4. Anestro.....	19
2.2. Inseminação artificial.....	20
2.2.1. Tipo de sémen.....	20
2.2.2. Técnicas de inseminação artificial.....	21
2.2.3. Métodos de seguimento de cio.....	23
2.2.3.1. Citologia vaginal.....	23
2.2.3.2. Concentração sérica de progesterona.....	24
2.2.3.3. Vaginoscopia.....	25
2.2.3.4. Ultrassonografia ovárica.....	26
2.2.3.5. Impedância elétrica do muco vaginal e pico de LH.....	26
2.3. Fisiologia da gestação.....	27
2.4. Diagnóstico de gestação.....	28
2.4.1. Ultrassonografia.....	28
2.4.2. Radiografia.....	29
2.4.3. Palpação abdominal.....	29
2.4.4. Relaxina.....	30
2.5. Infertilidade.....	30
2.6. Endometrite noutras espécies.....	31
2.6.1. Fisiopatologia.....	31
2.6.2. Diagnóstico.....	33
2.6.3. Tratamento.....	35
2.7. Endometrite na espécie canina.....	36
3. Material e Métodos.....	38
3.1. Caracterização da amostragem de estudo.....	38
3.2. Colheita e análise das amostras.....	38
3.2.1. Determinação da fase do ciclo éstrico.....	38
3.2.1.1. Citologia vaginal.....	38
3.2.1.2. Progesterona.....	39

3.2.2.	Procedimento de lavagem uterina e biópsia uterina.....	39
3.2.3.	Bacteriologia.....	40
3.2.3.1.	Teste de suscetibilidade a antibióticos.....	40
3.2.3.2.	Rastreio da atividade de carbapenemases nas Enterobacterales.....	41
3.2.3.3.	Identificação da espécie dos isolados bacterianos.....	41
3.2.4.	Citologia endometrial	43
3.2.5.	Histopatologia.....	43
4.	Resultados.....	43
4.1.	Caracterização da amostra.....	43
4.2.	Fase do ciclo éstrico.....	44
4.3.	Histopatologia.....	45
4.4.	Citologia endometrial.....	46
4.5.	Análise Bacteriológica	47
4.5.1.	Teste de suscetibilidade a antibióticos.....	49
5.	Discussão	51
6.	Conclusões.....	61
7.	Referências Bibliográficas	62

Índice de Figuras

Figura 1: Representação gráfica da distribuição das intervenções cirúrgicas observadas durante o período de estágio.	14
Figura 2: Representação gráfica do número de animais observados nas rotações de cirurgia e de consultas.....	16
Figura 3: Cateterização cervical com a pinça de biópsia.....	40
Figura 4: Citologia vaginal: a) Visualização de uma célula espumosa (<i>foam cell</i>), com vacúolos citoplasmáticos e núcleo excêntrico (100X, Diff-Quik®); b) Visualização de diplococo (seta) fagocitado por um neutrófilo (nt) (100X, Diff-Quik®).....	45
Figura 5: Biópsia uterina na qual é possível identificar os constituintes do endométrio, incluindo glândulas endometriais, bem diferenciadas e suportadas por um estroma laxo (20X, H&E).....	46
Figura 6: Presença de artefactos de esmagamento em toda a amostra, associados à colheita por via transcervical (10X, H&E).	46
Figura 7: Citologia endometrial: a) Presença de células epiteliais (CL), neutrófilos (nt), linfócitos (lt) e monócitos (mt) (100X, Hemacolor®); b) Presença de uma célula epitelial, com contaminação por eritrócitos (40X, Hemacolor®).....	47
Figura 8: Representação gráfica da distribuição dos agentes bacterianos obtidos nas amostras colhidas via lavagem uterina e biópsia uterina de cadelas clinicamente saudáveis.	48
Figura 9: Representação gráfica do número de cadelas que apresentaram crescimento bacteriano por técnica de colheita de amostra (lavagem uterina e biópsia uterina).....	49

Índice de Tabelas

Tabela 1: Distribuição das consultas acompanhadas por especialidade clínica.....	15
Tabela 2: Caracterização dos oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para a identificação da espécie <i>Escherichia coli</i>	42
Tabela 3: Caracterização dos oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para a identificação das espécies <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i>	42
Tabela 4: Teste de suscetibilidade a antibióticos para os isolados da ordem Enterobacterales.	49
Tabela 5: Teste de suscetibilidade a antibióticos para os isolados de <i>Enterococcus</i> spp.....	50
Tabela 6: Teste de suscetibilidade a antibióticos para os isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	51

Índice de Apêndices

Apêndice A1: Formulário de Consentimento.	I
Apêndice A2: Questionário realizado aos tutores.	II

1. Casuística do estágio

Para finalizar o Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona – Centro Universitário Lisboa, o autor realizou o estágio curricular no AniCura Atlântico Hospital Veterinário, sob a orientação da Professora Doutora Michelle Serafim e coorientação da Professora Doutora Adriana Belas e do Professor Dr. Paulo Borges, este último, responsável pelo Centro de Reprodução Veterinário do Atlântico, perfazendo um total de 980 horas durante 6 meses, com início a cinco de setembro de 2022 e fim a cinco de março de 2023. Este estágio, cuja componente prática corresponde à área de animais de companhia, é essencial na preparação do estagiário para a sua profissão futura, ao permitir adquirir conhecimentos práticos e teóricos, exercer atividades médicas, fomentar o trabalho em equipa e desenvolver capacidades de comunicação.

O AniCura Atlântico Hospital Veterinário dispõe de seis consultórios, dois para cães, dois para gatos, um para o Centro de Reprodução e um para o Centro de Cardiologia; dois blocos cirúrgicos; duas áreas de internamento distintas, uma para cães e outra para gatos; uma unidade de isolamento para doenças infectocontagiosas; três locais para exames complementares de imagiologia, um para Tomografia Computorizada, um para Radiografia e outro para Ultrassonografia; e, ainda, um laboratório para a realização de análises ao sangue e urina e avaliação de amostras ao microscópio ótico.

O estágio está organizado em três áreas: internamento, cirurgia e acompanhamento de consultas; com horário rotativo, incluindo turnos diurnos, noturnos, feriados e fins de semana.

No internamento, o estagiário teve a oportunidade de acompanhar a passagem dos casos clínicos, tendo como funções a realização do exame físico, a monitorização dos sinais vitais e fluidoterapia, o fornecimento de água e alimento e a administração da medicação aos animais internados. Cabe também ao mesmo auxiliar na contenção dos animais em causa para determinados atos, como a limpeza de feridas, colocação de cateteres, colheita de sangue e realização de exames complementares de diagnóstico, bem como na limpeza e desinfecção das *boxes*. Por sua vez, foi permitido ao estagiário praticar o procedimento de cistocentese, a colheita de sangue, a colocação de cateteres e definir a medicação e recomendações das altas hospitalares.

Durante o turno da noite, o estagiário administrava a medicação instituída, acompanhava o serviço de urgência e, na manhã seguinte, limpava e desinfetava as *boxes* e fornecia água e alimento aos animais internados.

Durante a rotação de cirurgia, o estagiário recebia e pesava os animais e auxiliava, ou realizava de forma autónoma, na pré-medicação, colocação do cateter, tricotomia e limpeza do animal. No bloco cirúrgico, o estagiário colaborava na entubação e posicionamento do animal, na preparação do material cirúrgico e na colocação do pulsioxímetro, dos elétrodos do eletrocardiograma, do medidor da pressão arterial e da temperatura corporal. Quando necessário, foi possível ao estagiário ser o ajudante do cirurgião e foi ainda permitido praticar incisões e suturas. As intervenções cirúrgicas assistidas incluíram a cirurgia de tecidos moles, eletiva [ovariohisterectomia (OVH), ovariectomia (OVE) e orquiectomia], endoscópica, ortopédica, odontológica e cesariana, sendo que as cirurgias de tecidos moles foram as mais frequentes (Figura 1). Nas cesarianas, o estagiário tinha como função auxiliar a cirurgia ou a reanimação neonatal, que incluía a aspiração de secreções nasais e orais, a fricção e estimulação dos neonatos, o *milking* do cordão umbilical e, posteriormente, a ingestão de leite por sonda orogástrica.

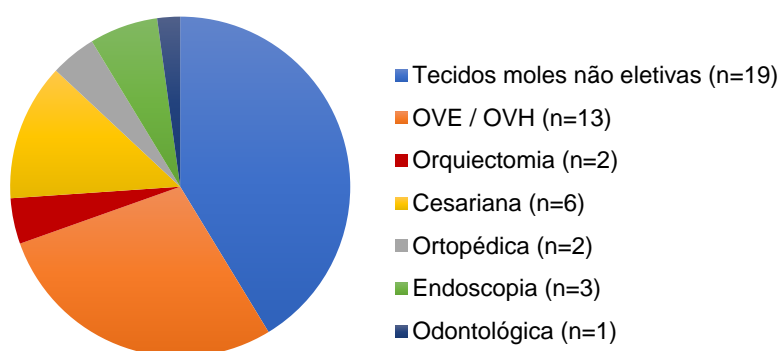


Figura 1: Representação gráfica da distribuição das intervenções cirúrgicas observadas durante o período de estágio.

No acompanhamento de consultas, o estagiário auxiliava o Médico Veterinário nos procedimentos necessários e na realização de análises e discutia os achados clínicos, os diagnósticos diferenciais e a abordagem terapêutica. O estagiário teve a oportunidade de assistir aos serviços de Imagiologia, nomeadamente na interpretação e discussão dos achados da ultrassonografia, radiografia e tomografia computadorizada e, ainda, administrar vacinas, colher sangue e iniciar e terminar consultas. Foi também possível assistir a uma grande variedade de consultas, que podem ser divididas em consultas de seguimento e das áreas clínicas de teriogenologia, gastroenterologia, urologia, oncologia, dermatologia, cardiologia, pneumologia, medicina profilática, endocrinologia, neurologia, ortopedia, urgências, doenças infectocontagiosas, intoxicação, doenças imunomediadas, neonatologia, oftalmologia e de *check-up* geriátrico, tendo em conta que existiram consultas associadas a mais que uma área clínica (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição das consultas acompanhadas por especialidade clínica.

Tipo de consulta	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Teriogenologia	58	14,1
Gastroenterologia	47	11,4
Urologia	41	9,9
Consulta de seguimento	40	9,7
Medicina profilática	33	8,0
Ortopedia	29	7,0
Endocrinologia	28	6,8
Oncologia	25	6,1
Neurologia	24	5,8
Dermatologia	20	4,9
Urgências	17	4,1
Pneumologia	15	3,6
Cardiologia	11	2,7
Doenças infectocontagiosas	6	1,5
Intoxicação	6	1,5
Doenças imunomediadas	4	1,0
Neonatologia	3	0,7
Oftalmologia	3	0,7
<i>Check-up</i> geriátrico	2	0,5

A teriogenologia foi a especialidade clínica mais acompanhada, na qual o estagiário pôde participar em diagnósticos de gestação por ultrassonografia e na contagem de fetos por radiografia, prever a data de parto, auxiliar em inseminações artificiais e na colheita e criopreservação de sêmen, assistir a consultas de infertilidade e realizar citologias vaginais.

Dos casos em que o estagiário participou durante as rotações de cirurgia e acompanhamento de consultas, a espécie animal mais observada foi a de canídeos ($n=253$), seguida de felídeos ($n=128$), enquanto um lagomorfo representou o grupo de animais exóticos (Figura 2).

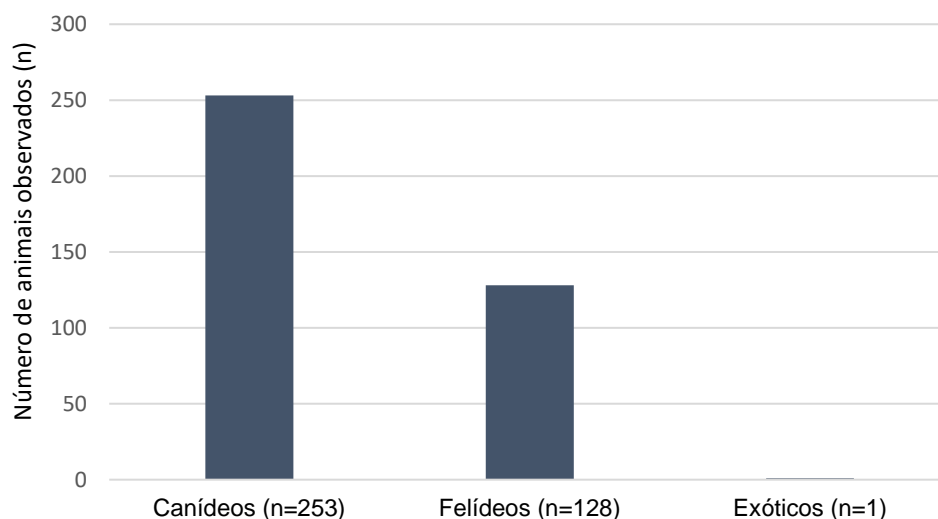


Figura 2: Representação gráfica do número de animais observados nas rotações de cirurgia e de consultas.

2. Introdução

Em virtude da relação estabelecida entre cães e os seus tutores, benéfica para a saúde física e mental, tem-se verificado um crescente interesse na reprodução desta espécie (Gee *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021).

Para atender às exigências dos criadores e maximizar as taxas de gestação, é necessário ter conhecimento da fisiologia reprodutiva. Por exemplo, a identificação incorreta do período fértil na cadela é a principal razão para uma aparente infertilidade, o que causa frustração por parte dos criadores, principalmente em casos de maior investimento na seleção de características de determinada raça (Gifford, Scarlett & Schlafer, 2014; García Mitacek *et al.*, 2017).

A cadela é uma espécie monoéstrica, aparentemente não sazonal, que cicla cerca de duas vezes por ano. É dotada de ovulação espontânea e capaz de dar origem a vários descendentes por parto. Por outro lado, algumas raças, como é o caso do Basenji, ciclaram uma vez por ano (Concannon, 2011; Nagashima & Songsasen, 2021; Sasidharan *et al.*, 2021).

A puberdade representa o período no qual um animal se torna apto do ponto de vista reprodutivo. Geralmente, raças pequenas e miniaturas atingem a puberdade mais cedo (entre os 5 e 6 meses) do que raças maiores (por volta dos 18 meses), embora haja uma grande variedade de idades entre raças (Gobello, 2014; Schäfer-Somi, Kaya & Aslan, 2022). O seu início é marcado pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-ovários, responsável por regular a função reprodutiva (Park *et al.*, 2023).

O aumento da libertação pulsátil da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), produzida no hipotálamo, induz, como o nome indica, a produção de gonadotrofinas, pela pituitária anterior, nomeadamente a hormona folículo-estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH) que, por sua vez, promovem o crescimento folicular e, conseqüentemente, um aumento na produção ovárica de estradiol e progesterona. O aumento do nível de estradiol exerce um efeito de *feedback* negativo na produção de GnRH, reduzindo, assim, a libertação de FSH e LH (Gołyszny, Obuchowicz & Zieliński, 2022; Schäfer-Somi *et al.*, 2022; Park *et al.*, 2023). Estas flutuações hormonais dividem a fase reprodutiva da cadela nas quatro fases do ciclo éstrico: proestro, estro, diestro e anestro (Nagashima & Songsasen, 2021).

2.1. Ciclo éstrico

2.1.1. Proestro

A fase de proestro tem uma duração média de 9 dias (variando entre 5 e 20 dias) e inicia-se com o aparecimento de sinais característicos associados ao aumento da concentração sérica de estradiol. Estes sinais incluem edema vulvar e corrimento serosanguinolento vulvar, devido à diapedese de eritrócitos, que contêm hemoglobina, no útero. A libertação de feromonas, por meio de secreções vaginais, dos sacos anais e da urina, atrai os machos, embora a cópula seja recusada pelas fêmeas (Concannon, 2011; Romagnoli & Lopate, 2016).

As concentrações de LH e de FSH permanecem baixas devido ao efeito de *feedback* negativo exercido pelo aumento contínuo de estradiol. Porém, ao atingir o seu pico de produção, induz, por sua vez, o aumento da produção de LH (Concannon, 2011; Romagnoli & Lopate, 2016). Horas antes, ou durante o início deste aumento, inicia-se a metaplasia das células da granulosa e da teca em células lúteas (luteinização folicular pré-ovulatória), dando origem a um primeiro aumento da concentração sérica de progesterona (≈ 2 ng/ml) (Concannon, 2011; Hollinshead & Hanlon, 2019; Kowalewski, Pereira & Kazemian, 2020).

2.1.2. Estro

A aceitação da cópula marca o início do estro. Observa-se uma diminuição na turgidez vulvar, bem como no corrimento serosanguinolento, que adquire uma tonalidade amarelada. Esta fase apresenta também uma duração média de 9 dias, podendo variar entre 4 e 24 dias (Concannon 2011; Romagnoli & Lopate, 2016).

No início deste período dá-se o pico de LH que, ao ativar os folículos antrais, induz a ovulação nas 48 a 60 horas seguintes (Concannon 2011, Romagnoli & Lopate, 2016; Hollinshead & Hanlon, 2019; De Los Reyes *et al.*, 2017). Ao contrário de outros mamíferos,

em que o óócito se encontra em metafase II (MII), pronto a ser fertilizado, no caso dos canídeos, o gâmeta ovulado encontra-se no estado de vesícula germinal (profase I) e o processo de maturação decorre no oviduto durante as 48 a 72 horas seguintes (Lee *et al.*, 2018; No *et al.*, 2018).

Ao longo do estro, verifica-se um pico na concentração de FSH, 0 a 2 dias após o pico de LH, uma diminuição contínua da concentração sérica de estradiol e um segundo aumento da concentração sérica de progesterona após a ovulação (p.ov), devido à luteinização dos folículos ovulados (entre $4,8 \pm 0,9$ ng/ml e $7,2 \pm 1,3$ ng/ml) (Concannon 2011, Romagnoli & Lopate, 2016; Hollinshead & Hanlon, 2019). A progesterona parece exercer um efeito de *feedback* negativo na secreção pulsátil de GnRH e, conseqüentemente, na de LH e FSH que diminuem progressivamente durante esta fase (Herbison, 2020).

2.1.3. Diestro

Ao longo da fase de diestro, os machos já não se sentem atraídos e a vulva encontra-se reduzida de tamanho e sem corrimento associado (Romagnoli & Lopate, 2016). A progesterona, hormona essencial para a manutenção da gestação, é unicamente produzida pelo corpo lúteo canino, ao contrário de outras espécies domésticas, nas quais a sua produção é atribuída à placenta (Kowalewski *et al.*, 2015; Tavares Pereira *et al.*, 2019; Papa & Kowalewski, 2020; Tavares Pereira *et al.*, 2022a). Esta hormona promove o encerramento do cérvix, de modo a garantir um ambiente adequado para a fertilização e livre de infeções ascendentes (Patel *et al.*, 2015; Mason, 2018).

As concentrações séricas de progesterona são semelhantes entre cadelas gestantes e não gestantes, atingindo um pico entre os dias 15 e 30 p.ov (Tavares Pereira *et al.*, 2019; Hinderer *et al.*, 2021).

Durante a primeira metade do diestro, isto é, entre os dias 24 a 28 p.ov, a função lútea está dependente do suporte das gonadotrofinas (Kowalewski *et al.*, 2015; Papa & Kowalewski, 2020; Tavares Pereira *et al.*, 2022a). Contudo, a partir do dia 30 p.ov a produção de progesterona requer o suporte da LH e, predominantemente, da prolactina (Concannon 2011; Kowalewski *et al.*, 2015; Tavares Pereira *et al.*, 2019). Apesar dos níveis de prolactina se manterem elevados no final do diestro, a regressão lútea continua a decorrer, possivelmente devido a uma diminuição do efeito da prostaglandina E na expressão dos recetores da prolactina, resultando, desta forma, numa potencial dessensibilização do corpo lúteo a esta hormona hipofisária (Kowalewski *et al.*, 2020).

Em cadelas gestantes, dá-se uma luteólise aguda no pré-parto, aproximadamente 60 dias p.ov, devido à produção de prostaglandina F2alfa (PGF2 α) pelos trofoblastos placentários

(Tavares Pereira *et al.*, 2019; Kowalewski *et al.*, 2020; Papa & Kowalewski, 2020). Por outro lado, em cadelas não gestantes, a regressão lútea ocorre gradualmente durante a última 1 a 2 semanas do diestro e não é modulada pela PGF2 α endógena (Kowalewski, Mutembei & Hoffmann, 2008; Romagnoli & Lopate, 2016; Papa & Kowalewski, 2020). Contudo, o corpo lúteo apresenta recetores para esta prostaglandina, cuja expressão aumenta ao longo deste período, o que explica o aumento da sua sensibilidade à administração de PGF2 α exógena (Kowalewski *et al.*, 2008).

Como consequência de uma fase lútea prolongada em cadelas não gestantes, por ausência de luteolisina, é possível que estas sofram de uma síndrome denominada por pseudociese ou pseudogestação (Tavares Pereira *et al.*, 2022a). Esta é caracterizada pelo desenvolvimento da glândula mamária, lactação e aparecimento de comportamentos maternos, como anorexia, letargia, nidificação e adoção de objetos ou animais pequenos, podendo mesmo, por vezes, apresentar agressividade. A hormona de crescimento, induzida pela progesterona, promove a proliferação do epitélio mamário, enquanto a prolactina, cujo aumento se inicia com a diminuição dos níveis de progesterona, estimula a produção de leite e o comportamento maternal (Lezama-García *et al.*, 2019; Gobello, 2021).

2.1.4. Anestro

O início da fase de anestro é definido como a permanência de níveis de progesterona abaixo de 1 a 2 ng/ml. Esta fase tem uma duração mínima de 2 a 3 meses, necessária para a reparação do endométrio, completada no final deste período, que pode variar até aos 8 a 12 meses (De Gier *et al.*, 2008; Concannon, 2011; Romagnoli & Lopate, 2016; De los Reyes *et al.*, 2017; Kowalewski *et al.*, 2020).

À medida que o anestro progride, verifica-se um aumento da libertação pulsátil de GnRH pelo hipotálamo e da sensibilidade da hipófise a esta hormona, representada por um aumento dos níveis de FSH e LH, bem como da sensibilidade dos ovários a estas gonadotrofinas, culminando no aumento do estradiol circulante (Concannon, 2011; Romagnoli & Lopate, 2016; Kutzler, 2018). A FSH, para além de iniciar a foliculogénese, induz a expressão de recetores para a LH nas células da granulosa, o que irá conferir à LH, no final do anestro, o papel principal no suporte da maturação folicular. O aumento da frequência pulsátil da LH precede o início do proestro seguinte (De Gier *et al.*, 2008; De los Reyes *et al.*, 2017; Kutzler, 2018).

2.2. Inseminação artificial

A inseminação artificial (IA) consiste na colheita de sémen de um macho reprodutor e posterior introdução no trato genital feminino, sem contacto sexual. É um procedimento cada vez mais requisitado pelos criadores, dadas as várias vantagens que apresenta: permite a seleção de machos reprodutores, de qualquer parte do mundo, para melhoramento genético, a preservação de sémen no banco de esperma para uso futuro e a inseminação de várias fêmeas com o mesmo sémen; assegura a diversidade genética; reduz a transmissão de doenças sexualmente transmissíveis, como brucelose, leptospirose, raiva, herpesvírus canino, leishmaniose, toxoplasmose e tumor venéreo transmissível; evita problemas associados à cópula, como alteração da conformação genital, agressão, dor, inexperiência ou desproporção de tamanho entre ambos e o *stress* e custos associados ao transporte (Payan-Carreira, Miranda & Niżański, 2011; Gaytán *et al.*, 2020; Quartuccio *et al.*, 2020; Mahiddine & Kim, 2021; Suzuki, Watanabe & Abe, 2022).

Melhorar as taxas de gestação e o tamanho da ninhada, garantindo a proteção da cadela, são os objetivos pretendidos pelos criadores. Para tal, o sucesso da inseminação depende do tipo de sémen, técnica de IA e da determinação do momento ótimo de fertilidade (Hollinshead & Hanlon, 2017; Mason, 2018; Quartuccio *et al.*, 2020).

2.2.1. Tipo de sémen

O sémen ejaculado divide-se em três porções: a primeira (pré-espermática) e a terceira (prostática) contêm fluido prostático, enquanto a segunda porção, rica em espermatozoides, oriunda do epidídimo, deve ser, tanto quanto possível, separada das restantes aquando da IA ou criopreservação do sémen (Kustritz, 2007; Payan-Carreira *et al.*, 2011; Mason, 2018).

O sémen fresco garante uma qualidade superior, apresentando melhores parâmetros reprodutivos e maior viabilidade no trato reprodutivo feminino (até 7 dias), em comparação com sémen refrigerado e congelado, que apresentam uma viabilidade de 24 horas e entre 12 e 24 horas, respetivamente, devido ao choque térmico a que são sujeitos (Niżański, 2006; Payan-Carreira *et al.*, 2011; Hollinshead & Hanlon, 2017; Sugai *et al.*, 2023). O processo de criopreservação induz tanto o aumento da produção de espécies reativas ao oxigénio, como a redução da ação do sistema antioxidante do próprio espermatozóide. O *stress* oxidativo resultante deste desequilíbrio provoca lesão celular, verificando-se, após a descongelação do sémen, a diminuição da motilidade progressiva e da capacidade de aderência às células epiteliais do oviduto, perda da integridade da membrana, alteração da morfologia normal e início precoce da capacitação e da reação acrossómica (Burgess, Clutterbuck & England,

2012b; Lucio *et al.*, 2016; de la Fuente-Lara *et al.*, 2019; Lechner *et al.*, 2021; Usuga *et al.*, 2021; Sugai *et al.*, 2023). A capacitação é o conjunto de alterações que completam a maturação dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino, tornando-os aptos a penetrar a zona pelúcida para fecundar o óócito maduro (reação acrossômica) (Burgess *et al.*, 2012b; Chhikara *et al.*, 2022). Desta forma, as células espermáticas presentes encontram-se num estado de apoptose, com conseqüente redução da viabilidade e potencial fertilizante. Diluentes à base de leite desnatado, glutathiona, ergotionina e quercetina, são usados como crioprotetores, pelas suas propriedades anti-oxidantes, para melhorar a qualidade do sémen, sendo a gema de ovo, o mais comum em clínica (Abe *et al.*, 2017; Kawasaki *et al.*, 2020; Mahiddine & Kim, 2021; Usuga *et al.*, 2021).

2.2.2. Técnicas de inseminação artificial

Na inseminação vaginal, o sémen é depositado na vagina cranial, próximo ao orifício cervical externo, seguido da terceira fração do ejaculado, de modo a mimetizar a pressão exercida, durante a cópula natural, pela fração prostática, que facilita a passagem dos espermatozoides pelo cérvix até ao útero da cadela. Na ausência da terceira fração ou presença de contaminantes como sangue, é utilizado um extensor artificial (Linde-Forsberg, Holst & Govette, 1999; Niżański, 2006; Mason, 2016; Hollinshead & Hanlon, 2017; Mason, 2018). Contudo, este tipo de inseminação apresenta taxas de parto reduzidas quando utilizado sémen congelado, devido à sua menor longevidade e capacidade fertilizante, bem como à distância a percorrer para atingir o oviducto (Linde-Forsberg *et al.*, 1999; Niżański, 2006; de la Fuente-Lara *et al.*, 2019; Suzuki *et al.*, 2022).

A inseminação intrauterina pode ser realizada por via transcervical (assistida por endoscopia ou pelo método Norueguês) ou cirúrgica (laparotomia) (Suzuki *et al.*, 2022). A deposição intrauterina é o método de eleição no que toca ao uso de sémen congelado, pelos maus resultados que apresenta nas inseminações vaginais (Linde-Forsberg *et al.*, 1999; Niżański, 2006; Thomassen *et al.*, 2006; Mason, 2016).

O método Norueguês baseia-se na passagem de um cateter até ao útero, enquanto o operador fixa transabdominalmente o cérvix. É rápido, económico, não requer sedação, embora seja difícil em cadelas obesas ou de grande porte (Thomassen *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2022; Cochran *et al.*, 2023).

A inseminação transcervical assistida por endoscopia, considerada a mais prática e útil, consiste na introdução do endoscópio na vagina até à visualização do orifício cervical externo e posterior passagem do cateter de inseminação pelo canal de trabalho do endoscópio, até atravessar o cérvix e penetrar no lúmen uterino. Apesar da experiência

necessária do operador e dos custos do equipamento (endoscópio, insuflação com ar, fonte de luz e câmara de vídeo com transmissão de imagens para um ecrã), é uma técnica rápida, que normalmente não requer sedação e que permite a visualização do cérvix, garantindo a posição intrauterina do cateter e a observação de potenciais refluxos de sémen (Payan-Carreira *et al.*, 2011; Hollinshead & Hanlon, 2017; Suzuki *et al.*, 2022). Além disso, não é dificultada pela obesidade e porte da cadela, embora a presença de muco ou sangue possa prejudicar a visualização durante o procedimento (Payan-Carreira *et al.*, 2011; Mason & Rous, 2014; Hollinshead & Hanlon, 2017).

Durante a inseminação cirúrgica, o sémen é depositado nos cornos uterinos através de cateteres (p.e: cateteres intravenosos de 22 G), após exteriorização do útero por laparotomia, possibilitando a avaliação macroscópica de alterações no útero e ovários (Mason & Rous, 2014; Hollinshead & Hanlon, 2017; Mason, 2018). Contudo, a cirurgia e anestesia geral têm riscos associados, como bradicardia, pneumonia por aspiração, dor pós-operatória, inflamação, infeção e seroma do local de incisão, piómetra, deiscência da sutura e cicatrização prolongada (Mason & Rous, 2014; Gaytán *et al.*, 2020; Cochran *et al.*, 2023). Por estes motivos, em termos de bem-estar animal, esta técnica, apesar de apresentar boas taxas de gestação, não é justificável quando a inseminação assistida por endoscopia, que é menos invasiva, não apresenta resultados inferiores, sendo, por isso, ilegal em certos países, como o Reino Unido, Suécia e Noruega (Burgess, Mitchell & Thomas, 2012a; Mason & Rous, 2014; Hollinshead & Hanlon, 2017; Mason, 2018; Suzuki *et al.*, 2022). Por conseguinte, deve ser reservada para casos de anomalias anatómicas que impossibilitam a cateterização do cérvix ou a introdução do endoscópio na vagina quando utilizado sémen congelado (Payan-Carreira *et al.*, 2011).

Ao contrário das restantes técnicas de inseminação, nas quais se recomenda a estimulação digital da região vulvar (*Feathering*) no final do procedimento, de modo a induzir contrações miométriais para facilitar o transporte dos espermatozóides, durante a inseminação por laparotomia as contrações uterinas estão ausentes devido ao efeito da anestesia geral (Mason & Rous, 2014; Mason, 2016; Hollinshead & Hanlon, 2017; Gaytán *et al.*, 2020). Adicionalmente, esta técnica implica a possibilidade de realizar apenas uma única inseminação (Payan-Carreira *et al.*, 2011; Gaytán *et al.*, 2020). Teoricamente, quando utilizado sémen congelado, a probabilidade de inseminar no momento fértil do ciclo éstrico da cadela pode ser maximizada ao realizar duas inseminações artificiais, espaçadas de 24 horas (Linde-Forsberg *et al.*, 1999; Thomassen *et al.*, 2006). Por exemplo, Cochran *et al.* (2023) obtiveram melhor taxa de gestação com este protocolo, embora o mesmo não tenha sido verificado por

Thomassen *et al.* (2006), Mason e Rous (2014) e Hollinshead e Hanlon (2017), possivelmente porque a determinação do momento ótimo de fertilidade seja um fator mais determinante.

2.2.3. Métodos de seguimento de cio

O período fértil na cadela coincide com a presença de oócitos maduros (em MII), 2 a 5 dias p.ov. Os métodos disponíveis para detetar o momento ótimo de fertilidade incluem a vaginoscopia, medição da concentração sérica de LH, ultrassonografia ovárica, medição da resistência elétrica do muco vaginal, embora o protocolo mais frequente seja a combinação da citologia vaginal com a medição da concentração sérica de progesterona (Groppetti *et al.*, 2015; Hahn *et al.*, 2017; Hollinshead & Hanlon, 2019; Quartuccio *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021).

2.2.3.1. Citologia vaginal

O aumento contínuo de estradiol, que se verifica durante a fase de proestro, induz a proliferação do epitélio vaginal, com conseqüente menor aporte sanguíneo e de oxigénio às células epiteliais presentes na superfície da mucosa vaginal. Este processo promove a cornificação celular e picnose nuclear. Assim, a citologia vaginal permite determinar a fase do ciclo éstrico, através da presença e quantificação de cada tipo celular (Olğaç *et al.*, 2017; Mason, 2018; Reckers *et al.*, 2022).

Durante o anestro, a citologia vaginal é composta por poucas células não cornificadas: as parabasais, de pequena dimensão e núcleo circular, inalterado e proeminente; e intermédias, de morfologia semelhante, mas com rácio citoplasma/núcleo ligeiramente superior (Kustritz, 2020; Reckers *et al.*, 2022).

Na fase de proestro verifica-se uma alteração gradual da população celular, constituída inicialmente por células parabasais e intermédias, que posteriormente dão lugar a células com ratio citoplasma/núcleo aumentado, irregulares e com núcleo picnótico (células superficiais) ou ausente (células escamosas anucleares) (Arlt, 2018; Kustritz, 2020). No final do proestro, a citologia vaginal é constituída maioritariamente por estas células cornificadas ($\geq 70\%$) (Gloria *et al.*, 2018). É comum estarem presentes eritrócitos, neutrófilos e bactérias da microbiota vaginal (Groppetti *et al.*, 2012; Lopate, 2016).

A definição de início do estro citológico varia na literatura, sendo caracterizado pela ausência de neutrófilos e presença de 100% de células cornificadas (Hollinshead & Hanlon, 2017), $\geq 90\%$ das mesmas (Kim, Travis & Meyers-Wallen, 2007; Gloria *et al.*, 2018) ou ainda $\geq 80\%$ (Linde & Karlsson, 1984; Bouchard *et al.*, 1991). Está também descrito como 100% de células cornificadas e mais de 80% (Bergeron *et al.*, 2014) ou 50% (Mason, 2018; Kustritz,

2020) de células escamosas anucleares. É possível também observar eritrócitos e bactérias (Lopate, 2016; Kustritz, 2020).

O diestro é representado por um influxo inicial de neutrófilos, diminuição das células cornificadas em 20 a 50% e o retorno das células parabasais e intermédias (Kim *et al.*, 2007; Arlt, 2018; Gloria *et al.*, 2018; Reckers *et al.*, 2022).

Os corantes Diff-Quick® e Hemacolor® são os mais usados para observar o esfregaço ao microscópio. Os corantes Papanicolau e Harris-Shorr coram as células epiteliais que se encontram impregnadas de estrogénio, permitindo uma identificação facilitada das células cornificadas, porém, são pouco utilizados devido ao custo e tempo necessário do procedimento (Arlt, 2018; Reckers *et al.*, 2022).

A citologia vaginal é uma técnica comum em clínica, rápida e barata, mas subjetiva na determinação da fase do ciclo éstrico devido à variação existente nos métodos de coloração, na interpretação de cada tipo celular e no critério para definir o estro, bem como à semelhança da população celular entre o final do proestro e início do estro e entre o final do estro e início do diestro. Adicionalmente, não permite datar a ovulação e, por isso, o momento ótimo de fertilidade, pelo que deve ser conjugada com outros meios de diagnóstico como a medição da concentração sérica de progesterona (Lopate, 2016; Olğaç *et al.*, 2017; Arlt, 2018; Reckers *et al.*, 2022).

2.2.3.2. Concentração sérica de progesterona

O primeiro aumento marcado da concentração sérica de progesterona (≈ 2 ng/ml), resultante da luteinização pré-ovulatória, permite identificar o início do pico de LH pré-ovulatório (pré-ov). Com base neste valor, é possível estimar indiretamente o momento da ovulação, que ocorre nas 48 a 60 horas seguintes, demonstrado também por um segundo aumento da concentração sérica de progesterona para valores entre $4,8 \pm 0,9$ e $7,2 \pm 1,3$ ng/ml (Groppetti *et al.*, 2015; Hahn *et al.*, 2017; Hollinshead & Hanlon, 2019).

A concentração e curva desta hormona não é influenciada pelo peso e raça, pelo que pode ser usada como marcador do pico de LH pré-ov e da ovulação. A concentração não altera a taxa de gestação nem o tamanho da ninhada, embora um aumento lento esteja associado a um menor tamanho da ninhada quando usado sémen congelado, que apresenta menor longevidade e viabilidade (Hollinshead & Hanlon, 2017; Hollinshead & Hanlon, 2019). Assim sendo, a IA com este tipo de sémen deve ser realizada o mais próximo possível do período em que os oócitos se encontram em MII, ou seja, entre 5 e 6 dias após o pico de LH pré-ov, ou 3 a 4 dias p.ov. Relativamente ao sémen fresco ou refrigerado, ambos de qualidade

superior, a IA pode ser realizada entre 3 e 5 dias após o pico de LH pré-ov ou 2 a 4 dias p.ov. O momento ótimo de IA deve ser confirmado pelo aumento contínuo dos valores de progesterona acima de 10 a 20 ng/ml (Rota *et al.*, 2015; Hollinshead & Hanlon, 2019).

O período fértil termina com o primeiro dia do diestro, que está associado a valores de progesterona acima de 36,9 ng/ml. Durante o anestro, a média é de $0,38 \pm 0,14$ ng/ml (Groppetti *et al.*, 2015; Rota *et al.*, 2015).

Deste modo, a medição da concentração sérica de progesterona é o método mais prático para determinar a data da IA. Contudo, os resultados obtidos podem variar consoante o *kit* comercial usado (Hahn *et al.*, 2017; Hollinshead & Hanlon, 2019).

2.2.3.3. Vaginoscopia

A vaginoscopia é um método não invasivo que permite a rápida exploração de toda a extensão da vagina. As flutuações que se verificam nas concentrações séricas de estradiol e progesterona ao longo do ciclo éstrico, promovem alterações a nível da mucosa vaginal, possibilitando a aplicação deste método no auxílio da determinação da fase do ciclo éstrico (Payan-Carreira *et al.*, 2011; Lévy, 2016). Durante o anestro, é possível visualizar uma mucosa vaginal fina, com coloração vermelha, aparência seca e lúmen estreito (Concannon, 2011; Lévy, 2016). Na fase de proestro, o aumento da concentração de estradiol promove alterações como edema da mucosa e das pregas vaginais, que se tornam arredondadas, lisas e rosadas, e a presença de corrimento serosanguinolento (Concannon, 2011; Payan-Carreira *et al.*, 2011; Lévy, 2016). A diminuição da concentração de estradiol e o aumento de progesterona, durante o estro, induzem a crenulação da mucosa vaginal, que se torna atrofiada, enrugada e adquire uma coloração pálida, com pregas vaginais reduzidas e angulares, verificando-se uma redução no turgor vaginal e um lúmen mais amplo. A máxima crenulação, cerca de 4 a 5 dias após o pico de LH pré-ov ou 2 a 3 p.ov, corresponde ao período fértil na cadela (Concannon, 2011; Payan-Carreira *et al.*, 2011; Lévy, 2016; Hollinshead & Hanlon, 2017; Mason, 2018). A mucosa vaginal torna-se novamente fina na fase de diestro, com coloração rosada acinzentada, pregas vaginais planas ou redondas e, por vezes, com corrimento de tipo mucóide (Payan-Carreira *et al.*, 2011; Lévy, 2016).

Este procedimento poderá estar associado à formação de petéquias devido ao contacto do endoscópio na mucosa fina e sensível, nas fases de anestro e diestro (Concannon, 2011; Payan-Carreira *et al.*, 2011; Lévy, 2016).

2.2.3.4. Ultrassonografia ovárica

A ultrassonografia é um método de auxílio que permite identificar alterações durante o período periovulatório. Os folículos ováricos são visualizados no proestro e estro como estruturas circulares ou ligeiramente triangulares, anecogénicas e parede ecogénica fina, o que confere ao ovário uma aparência de favo de mel. Com a ovulação, os folículos tornam-se hipoecogénicos e os corpos lúteos formados, de maior diâmetro e parede mais espessada, adquirem novamente um centro anecogénico (Payan-Carreira *et al.*, 2011; Bergeron *et al.*, 2013; Barstow, Wilborn & Johnson, 2018; Tsuchida *et al.*, 2021). Contudo, fatores como a duração da ovulação (entre 48 e 72 horas), a semelhança na ecotextura entre o folículo pré-ov e o corpo lúteo, a luteinização folicular pré-ovulatória (característica singular na cadela) e o tempo que decorre até ao colapso do folículo ovulado, dificultam a datação do momento exato da ovulação (Bergeron *et al.*, 2013; Jurczak & Janowski, 2018; Tsuchida *et al.*, 2021).

Por sua vez, o *doppler a cores* é um método útil na deteção de variações do fluxo sanguíneo nos ovários e útero. Por exemplo, foi detetado um aumento da perfusão sanguínea ovárica na transição do proestro para estro (Aires *et al.*, 2022), correspondente ao pico de LH pré-ov, em 83% dos casos (Bergeron *et al.*, 2013), e ao período periovulatório, entre 1 dia antes da ovulação e 3 dias depois (Jurczak & Janowski, 2018), bem como na vascularização uterina no final do proestro (Jurczak & Janowski, 2018; Aires *et al.*, 2022).

O uso deste meio de diagnóstico implica a realização de exames diários, por operadores experientes e o uso de outros meios de diagnóstico para determinar o momento ótimo de fertilidade (Bergeron *et al.*, 2013; Tsuchida *et al.*, 2021; Jurczak & Janowski, 2018; Hollinshead & Hanlon, 2019).

2.2.3.5. Impedância elétrica do muco vaginal e pico de LH

Durante a transição do proestro para o estro, verifica-se o aumento da impedância do muco vaginal, obtida pela aplicação de uma corrente elétrica através de elétrodos em contacto com o muco, que medem a resistência à condutividade da respetiva corrente (Gurler *et al.*, 2018; Glencorse, Grupen & Bathgate, 2023). Contudo, é um método raramente usado na previsão do momento ideal para reproduzir, já que não é fiável na determinação da ovulação, requer exames diários e não é possível esterilizar o aparelho, o que aumenta o risco de transmissão de doenças (Bergeron *et al.*, 2014; Gurler *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2021).

Apesar da medição do pico de LH pré-ov ser considerada o método *gold standard*, não é praticada em clínica para estimar a ovulação, dado o custo e disponibilidade reduzida dos testes, variabilidade de resultados entre cadelas e necessidade de colher diariamente

sangue devido à curta duração do pico (24 a 60 horas) (Hase *et al.*, 2000; Rota *et al.*, 2015; Arlt, 2018; Hollinshead & Hanlon, 2019).

2.3. Fisiologia da gestação

Em cadelas, a gestação tem uma duração de cerca de 63 ± 2 dias p.ov (Eilts *et al.*, 2005; Mir *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2019; Hollinshead & Hanlon, 2017) e 65 ± 2 dias após o pico de LH pré-ov (Kim *et al.*, 2007; Hollinshead & Hanlon, 2017; Pereira *et al.*, 2019). Está descrito que a idade da cadela, o número de partos anteriores, tipo de inseminação (artificial ou natural), qualidade seminal e número de inseminações não têm influência na duração da gestação (Eilts *et al.*, 2005; Mir *et al.*, 2011; Hinderer *et al.*, 2021), embora Hollinshead e Hanlon (2017) tenham detetado um aumento de 0,11 dias por cada ano de idade a mais. Por outro lado, cadelas com peso inferior a 10 Kg ou com ninhadas compostas por um maior número de cachorros, tendem a parir mais cedo (Eilts *et al.*, 2005; Mir *et al.*, 2011; Hollinshead & Hanlon, 2017; Hinderer *et al.*, 2021). A variação consoante a raça está também descrita por alguns autores (Eilts *et al.*, 2005; Mir *et al.*, 2011; Hollinshead & Hanlon, 2017; Hinderer *et al.*, 2021).

O oviduto é composto por três segmentos: infundíbulo, ampola e istmo (Lee & Saadeldin, 2020). A fecundação do oócito secundário, em MII, pelo espermatozóide, ocorre na ampola, dando origem a um zigoto (Reynaud *et al.*, 2015; Lee & Saadeldin, 2020; Kowalewski, Pereira & Kazemian, 2020; Kowalewski *et al.*, 2021; Paulson & Comizzoli, 2021). O sucesso da fertilização depende da influência da progesterona, que promove a motilidade, capacitação e reação acrossómica dos espermatozoides, bem como a maturação oocitária (Reynaud *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2018). A partir do zigoto, após várias divisões celulares, passando pela fase de mórula, forma-se um blastocisto (Paulson & Comizzoli, 2021).

O embrião canino em suspensão, sob a forma de mórula ou blastocisto, inicia a migração uterina na junção útero-tubárica entre os 7 a 10 dias após a fertilização, que pode durar mais 9 a 10 dias (Graubner *et al.*, 2017; Kowalewski *et al.*, 2020; Kowalewski *et al.*, 2021).

A gestação inicia-se com a implantação de um blastocisto competente no endométrio, entre os dias 17 e 18 após a fertilização (Kowalewski *et al.*, 2020; Kowalewski *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2023). Para tal, é necessário que o endométrio seja preparado previamente, sob a influência do estradiol e da progesterona, de modo a estar recetivo (Kelleher, DeMayo & Spencer, 2019; Li *et al.*, 2023). O estradiol, secretado durante a fase de proestro, estimula a expressão de recetores para a progesterona e promove a reepitelização do endométrio, ao induzir a proliferação do epitélio uterino, que permite a regeneração das glândulas e do

estroma do endométrio e a angiogénese (Billhaq, Lee & Lee, 2020; Paulson & Comizzoli, 2021). A progesterona, por sua vez, promove a secreção glandular, cujo produto, denominado por histotrofo, por ser uma rica fonte nutritiva, constituída por proteínas, iões, lípidos, açúcares, aminoácidos e carboidratos, é essencial para o desenvolvimento tanto do embrião como da placenta (Kelleher *et al.*, 2019; Billhaq *et al.* 2020; Li *et al.*, 2023). Adicionalmente, a progesterona regula a transição das células do estroma uterino, através de alterações morfológicas e bioquímicas, em células maternas especializadas, designadas por células decíduais, que constituem a única fonte placentária de recetores para a progesterona. Este processo, designado por decidualização, é completado pela implantação do embrião (Aralla *et al.*, 2013; Graubner *et al.*, 2016; Kowalewski *et al.*, 2020; Kowalewski *et al.*, 2021; Paulson & Comizzoli, 2021; Tavares Pereira *et al.*, 2022b). A superfície de contacto entre o embrião e a mãe é criada pela invasão dos trofoblastos, células presentes na camada envolvente do blastocisto (Kowalewski *et al.*, 2020; Kowalewski *et al.*, 2021; Tavares Pereira *et al.*, 2022b). As interações que se estabelecem permitem o fornecimento de sangue materno e o desenvolvimento dos tecidos embrionários (Paulson & Comizzoli, 2021). Quando as vilosidades dos trofoblastos, presentes no córion, entram em contacto com a parede endotelial dos capilares maternas, forma-se a placenta endoteliocorial, composta por quatro anexos embrionários: córion, âmnio, saco vitelino e saco alantoico (Aralla *et al.*, 2013; Kowalewski *et al.*, 2020; Kowalewski *et al.*, 2021; Paulson & Comizzoli, 2021).

A concentração sérica de progesterona é semelhante entre cadelas gestantes e não gestantes, com exceção entre os 52 e 60 dias, quando se verifica níveis superiores em cadelas gestantes (Pereira *et al.*, 2019; Hinderer *et al.*, 2021). Quando os níveis de progesterona circulantes diminuem, seja devido à regressão lútea ou pela administração de antigestagénios, como a Aglepristona (bloqueador dos recetores da progesterona), as células decíduais da placenta sinalizam o trofoblasto fetal para iniciar a produção de PGF2 α luteolítica, causando uma diminuição aguda da concentração sérica de progesterona (Aralla *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2019; Nowak *et al.*, 2019; Kowalewski *et al.*, 2020; Kowalewski *et al.*, 2021). Em condições fisiológicas, esta luteólise antecede, entre 12 e 24 horas, o parto. Esta cascata luteolítica reflete a importância das células decíduais maternas na manutenção e terminação da gestação (Aralla *et al.*, 2013; Kowalewski *et al.*, 2021).

2.4. Diagnóstico de gestação

2.4.1. Ultrassonografia

A ultrassonografia é um método preciso para obter um diagnóstico de gestação precoce (Kinns & Nelson, 2018). Entre os 17 e 20 dias após o pico de LH pré-ov ou 15 a 18

dias p.ov, é possível observar vesículas embrionárias (estruturas circulares anecogénicas com parede fina) no útero (Pollard & Hecht, 2015; Beccaglia *et al.*, 2016; Lascialfari *et al.*, 2023). Contudo, a contagem destas estruturas durante esta fase pode sobrestimar o tamanho da ninhada, uma vez que poderão ser posteriormente reabsorvidas (Davidson & Baker, 2009; Kealy, McAllister & Graham, 2011; Kinns & Nelson, 2018). As reabsorções embrionárias são um achado comum em cadelas, com uma incidência que varia entre 10,6 e 25,9% e uma prevalência de 5 a 48,3% das gestações (England & Russo, 2006; Ortega-Pacheco *et al.*, 2006; Mir *et al.*, 2013; de Freitas *et al.*, 2016; Kinns & Nelson, 2018; Evci *et al.*, 2023; Lascialfari *et al.*, 2023). Desta forma, é aconselhado que o exame ecográfico, como diagnóstico de gestação, seja realizado a partir do dia 23 a 25 após o pico de LH pré-ov, no qual já é possível identificar o embrião com batimento cardíaco e avaliar a viabilidade embrionária. Adicionalmente, este meio permite monitorizar o desenvolvimento embrionário (até ao dia 35) e fetal, possibilitando a identificação de malformações fetais congénitas como anasarca, hidrocefalia e efusão pleural, e a datação da gestação, importante para prever a data de parto e, assim, minimizar as perdas neonatais durante este momento crítico (Kealy *et al.*, 2011; Pollard & Hecht, 2015; Evci *et al.*, 2023; Lascialfari *et al.*, 2023).

2.4.2. Radiografia

A mineralização fetal, que tem início a partir dos dias 43 a 46 após o pico de LH pré-ov, possibilita o diagnóstico por radiografia, sendo suficiente uma projeção lateral ao abdómen (Davidson & Baker, 2009; Beccaglia *et al.*, 2016). A sobreposição de fetos dificulta a contagem de cada crânio e respetiva coluna para determinar o tamanho da ninhada, embora este meio de diagnóstico seja mais preciso que a ultrassonografia, através da qual não é possível visualizar todo o útero na mesma janela acústica (Kealy *et al.*, 2011; Davidson & Baker, 2009; Kinns & Nelson, 2018). Contudo, não é útil para avaliar a viabilidade fetal, dado que apenas são visíveis sinais *post-mortem*, como alteração anormal da postura esquelética do feto ou acumulação de gás intrafetal (Davidson & Baker, 2009).

2.4.3. Palpação abdominal

A palpação abdominal já foi o método de diagnóstico de gestação mais comum, apresentando uma sensibilidade de 88% e especificidade de 73%, quando realizada na segunda metade da gestação (Kustritz, 2005). As vesículas embrionárias podem ser palpáveis como estruturas ovais a partir dos 20 dias após o pico de LH pré-ov, embora a sua deteção seja mais fácil entre os 31 e 33 dias. À medida que a gestação progride, a palpação destas estruturas torna-se mais difícil devido ao aumento do volume uterino (Barr, 1988; Johnston, Kustritz & Olson, 2001). Este é um método subjetivo, dificultado na presença de cadelas

obesas, com abdómen tenso, de maior porte ou com uma ninhada reduzida (Johnston *et al.*, 2001; Kustritz, 2005; Johnson, 2008).

2.4.4. Relaxina

Em cadelas, a relaxina é uma hormona detetável na circulação sanguínea apenas durante a gestação (Verstegen-Onclin & Verstegen, 2008; Kowalewski *et al.*, 2020). Uma vez que não há um aumento da concentração sérica de estradiol associado a este período e os níveis de progesterona são semelhantes, estejam gestantes ou não, a relaxina constitui o único marcador de diagnóstico de gestação em cadelas (Nowak *et al.*, 2017; Kowalewski *et al.*, 2020).

A sua principal fonte de produção são as células fetais citotrofoblasticas, na placenta, sendo também produzida pelo endométrio, miométrio e, menos significativamente, pelo corpo lúteo (Tamada *et al.*, 2010; Nowak *et al.*, 2017). Entre os dias 19 a 30 após o pico de LH pré-ov, a relaxina atinge uma concentração detetável e continua a aumentar até atingir um pico entre os 30 a 35 dias após o pico de LH pré-ov, permanecendo elevada até ao parto (Johnson, 2008; Verstegen-Onclin & Verstegen, 2008; Beccaglia *et al.*, 2016; Nowak *et al.*, 2017; Evci *et al.*, 2023). Contudo, mantém-se elevada durante dias após reabsorção embrionária ou aborto, não sendo, por isso, viável para monitorizar a viabilidade da ninhada (Verstegen-Onclin & Verstegen, 2008; Evci *et al.*, 2023).

2.5. Infertilidade

A infertilidade é definida como a incapacidade em ficar gestante e/ou produzir descendência viável (Dockweiler *et al.*, 2016). Em cadelas, a abordagem a este problema deve reunir informação sobre o manejo reprodutivo, isto é, como foi determinado o melhor momento para inseminar, o tipo e qualidade de sémen, técnica de inseminação e tipo de alimentação (Barstow *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2021). Em constraste com as dietas comerciais, corretamente formuladas para garantir as necessidades energéticas das cadelas gestantes, as dietas cruas [*biologically appropriate raw food* (BARF)] não só apresentam menor valor nutricional, como também aumentam o risco de infeção por agentes infecciosos associados a este tipo de alimentos (Uchańska *et al.*, 2022; Fontbonne, 2023). A fertilidade é também influenciada pela idade da cadela (mais novas tendem a ser mais férteis), condição corporal e defeitos genéticos e anatómicos, tais como a persistência do septo vaginal e estenoses, que interferem com a cópula e promovem infeções urinárias e vaginites (Lévy, 2016; Barstow *et al.*, 2018; Fontbonne, 2023).

As reabsorções embrionárias, abortos e redução da viabilidade da ninhada podem ter como causa infecções por agentes bacterianos (*Brucella canis*, *Leptospira* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp.), virais (Herpesvírus canino tipo 1, Parvovírus canino tipo 1 e vírus da esgana) e parasitários (*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*), embora pouco frequentes (Taques *et al.*, 2016; Hensel, Negron & Arenas-Gamboa, 2018; Quartuccio *et al.*, 2020; Tamiozzo, 2022; Uchańska *et al.*, 2022; Fontbonne, 2023).

Outras patologias associadas à infertilidade incluem: insuficiência lútea ou hipoluteodismo, quando a produção de progesterona pelo corpo lúteo não ultrapassa os 2 ng/ml necessários para manter a gestação; lesões uterinas, como a hiperplasia quística do endométrio, endometrite, fibrose das glândulas do endométrio e neoplasia; disfunção ovárica, induzida pela presença de quistos ou neoplasia; e doenças sistêmicas, como hipotireoidismo, diabetes mellitus e hiperadrenocorticism (Meyers-Wallen, 2007; Mir *et al.*, 2013; Barstow *et al.*, 2018; Cecere, Purswell & Panciera, 2020; Hinderer *et al.*, 2021; Sasidharan *et al.*, 2021; Fontbonne, 2023).

2.6. Endometrite noutras espécies

2.6.1. Fisiopatologia

O útero é composto por três camadas: o endométrio, o miométrio e o perimétrio. A primeira, mais interna, é constituída por células epiteliais e lâmina própria e encontra-se dividida em estrato compacto, em contacto com o lúmen uterino, e estrato esponjoso (Thompson *et al.*, 2020). A endometrite representa a inflamação do endométrio até ao estrato esponjoso e é considerada uma das principais causas de infertilidade na clínica de grandes animais (Praderio *et al.*, 2019; Lüttgenau *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2023; Pascottini *et al.*, 2023).

No caso das éguas, a inseminação (natural ou artificial) induz uma resposta inflamatória uterina fisiológica, de modo a facilitar a progressão dos espermatozóides e a eliminação do conteúdo excedente (espermatozóides, bactérias e exsudato inflamatório) em 48 horas (Khan *et al.*, 2017; Freccero *et al.*, 2022; Ghallab *et al.*, 2023).

Defeitos anatómicos do trato reprodutivo, nomeadamente na conformação do períneo, incompetência vestibulo-vaginal, estenose cervical e útero pendular, ou degenerativos do endométrio e miométrio, associados a multiparidade ou a idades avançadas, comprometem as contrações do miométrio e a drenagem linfática e, conseqüentemente, a *clearance* uterina, o que favorece a retenção de fluido intrauterino e a multiplicação dos

microrganismos presentes (Woodward *et al.*, 2012; Reghini *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2017; Lüttgenau *et al.*, 2021; Omar *et al.*, 2022; Ghallab *et al.*, 2023; Scarlet *et al.*, 2023).

Estas condições prolongam a resposta inflamatória por mais de 72 horas (Nash *et al.*, 2010; Christoffersen *et al.*, 2012; Woodward *et al.*, 2012; Lüttgenau *et al.*, 2021), desencadeando uma endometrite persistente induzida pela inseminação, que é caracterizada pela diminuição na frequência e intensidade das contrações uterinas (Khan *et al.*, 2017); desequilíbrio na resposta mediada por citocinas, devido ao aumento da interleucina-1 β e interleucina-6 (citocinas pró-inflamatórias) e diminuição da interleucina-10 (citocina anti-inflamatória) (Christoffersen *et al.*, 2012; Lüttgenau *et al.*, 2021); influxo superior de neutrófilos ao lúmen uterino (Reghini *et al.*, 2016; Friso *et al.*, 2019; Abdelnaby *et al.*, 2020); aumento da perfusão vascular uterina (Abdelnaby *et al.*, 2020) e dos níveis de óxido nítrico (Alghamdi *et al.*, 2005; Woodward *et al.*, 2012; Abdelnaby *et al.*, 2020), PGF2 α (Nash *et al.*, 2010) e de soro amilóide A (proteína de fase aguda) (Christoffersen *et al.*, 2012; Wojtysiak *et al.*, 2020) em comparação com éguas consideradas resistentes. O óxido nítrico atua como relaxante muscular, pelo que o seu aumento pode estar associado à diminuição da contractilidade uterina (Khan *et al.*, 2017; Freccero *et al.*, 2022).

Já em bovinos de aptidão leiteira, a endometrite ocorre maioritariamente no período após o parto, associada ao manejo nutricional, *stress* metabólico, alteração da resposta imunitária e colonização bacteriana no útero através do cérvix dilatado, principalmente em situações de distócia, pobres condições sanitárias no local de parto e retenção placentária (Osawa, 2021; Umar *et al.*, 2021; Pascottini *et al.*, 2023). Porém, Pascottini *et al.* (2016) reportaram uma prevalência de 7,86% de endometrite em novilhas nulíparas, sendo que a maior parte destas (70%) apresentava história de falha em conceber após uma IA. A menor proporção do grupo com a doença nunca foi inseminada, pelo que a endometrite desencadeada por infeções uterinas ascendentes durante o estro é uma possibilidade. Adicionalmente, foi registada uma menor taxa de concepção nas novilhas com endometrite e previamente inseminadas. Com base nestes resultados, os autores propõem que a inseminação em bovinos pode também induzir uma endometrite persistente.

A reduzida taxa de gestação inerente à endometrite pode advir da presença de um ambiente uterino adverso, que compromete o processo de implantação embrionária e o posterior aporte sanguíneo materno aos tecidos embrionários, ou do efeito luteolítico exercido pela produção exacerbada de PGF2 α (Khan *et al.*, 2017; Friso *et al.*, 2019; Paulson & Comizzoli, 2021; Morrell & Rocha, 2022; Freccero *et al.*, 2022; Ghallab *et al.*, 2023; Scarlet *et al.*, 2023), embora a concentração plasmática de progesterona tenha sido semelhante entre éguas suscetíveis, isto é, com acumulação de fluido intrauterino superior a 2 cm de

profundidade, e éguas resistentes a endometrite, após IA (Lüttgenau *et al.*, 2021). Sabe-se que, em mulheres, a endometrite crónica compromete o processo de decidualização, necessária ao sucesso da implantação do embrião e manutenção da gestação (Kuroda *et al.*, 2020).

2.6.2. Diagnóstico

Em éguas, os sinais clínicos podem incluir vaginite, cervicite, corrimento vulvar e acumulação de fluido intrauterino, embora a endometrite se apresente, maioritariamente, na forma subclínica, manifestando-se apenas por história de falha em conceber (de Amorim *et al.*, 2016; Morrell & Rocha, 2022; Pascottini *et al.*, 2023).

A ultrassonografia apresenta uma sensibilidade de 55 a 76% e especificidade de 92%, sendo possível identificar uma acumulação de fluido intrauterino, aumento da espessura do corpo e corno uterino e, através do *doppler*, da perfusão vascular uterina, embora não permita determinar a causa (Rua *et al.*, 2018; Abdelnaby *et al.*, 2020; Da Silva-Álvarez *et al.*, 2022; Teixeira-Soares *et al.*, 2022). Por outro lado, nos casos de endometrite subclínica estes sinais não são visíveis, pelo que é tipicamente detetada após obter resultados positivos na citologia e/ou bacteriologia (Ravaioli *et al.*, 2022).

A citologia é um método rápido e simples que permite identificar a presença de células inflamatórias (Rua *et al.*, 2018; Köhne *et al.*, 2020; Teixeira-Soares *et al.*, 2022). Contudo, os critérios de classificação de endometrite, nomeadamente a presença de mais de um a dois neutrófilos por campo, em 10 campos de ampliação total (Díaz-Bertrana *et al.*, 2021; Ghallab *et al.*, 2023) ou o rácio entre neutrófilos e células epiteliais, que varia desde 0,5% a mais de 10% (Christoffersen *et al.*, 2015; Rua *et al.*, 2018; Abdelnaby *et al.*, 2020; Teixeira-Soares *et al.*, 2022), diferem entre autores. A avaliação através do rácio entre neutrófilos e células epiteliais ($\geq 1\%$) registou uma sensibilidade superior (74% por lavagem uterina e 93% por zaragatoa) quando comparado com a presença de pelo menos um neutrófilo por campo de ampliação total (37% por lavagem uterina e 60% por zaragatoa), uma vez que este último método está limitado a uma menor quantidade de amostra avaliada (de Amorim *et al.*, 2016).

Os resultados também variam consoante a técnica de colheita da amostra. A amostra colhida por lavagem uterina, apesar de ser representativa de todo o órgão, está associada a uma maior dificuldade de interpretação, por apresentar pior preservação celular e maior quantidade de debris e eritrócitos. A zaragatoa e a escova de citologia permitem obter amostras com boa integridade celular, embora estas técnicas possam aumentar o número de falsos negativos por colherem apenas áreas focais, nas quais poderá não estar presente o foco inflamatório (de Amorim *et al.*, 2016; Rua *et al.*, 2018). Teixeira-Soares *et al.* (2022)

reportaram a mesma sensibilidade (76%) e especificidade (100%) para a técnica de lavagem uterina e escova de citologia. Por outro lado, no estudo de Christoffersen *et al.* (2015), a citologia esteve associada a uma baixa sensibilidade (8% a 9%), pelo que os autores consideraram a possibilidade de que infecções por *Escherichia coli*, a bactéria mais isolada neste estudo, possa ter um menor efeito quimiotático na migração de neutrófilos ao lúmen uterino.

As bactérias mais identificadas em éguas com história de infertilidade pertencem à microbiota vaginal (Malaluang *et al.*, 2023). *Escherichia coli* e *Streptococcus equi* subespécie *zoepidemicus* são as bactérias mais representativas, seguidas de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Klebsiella pneumoniae*. A endometrite fúngica, causada maioritariamente por *Aspergillus* spp. e *Candida* spp., apresenta uma prevalência reduzida, de 0,9 a 3,1% (Rua *et al.*, 2018; Pisello *et al.*, 2019; Díaz-Bertrana *et al.*, 2021; Omar *et al.*, 2022; Ravaioli *et al.*, 2022; Ghallab *et al.*, 2023).

Tal como para a citologia, os resultados da bacteriologia diferem (entre 25% e 93,2% de casos positivos) consoante a técnica de colheita da amostra relativamente à representatividade do órgão obtida (de Amorim *et al.*, 2016; Rua *et al.*, 2018; Pisello *et al.*, 2019; Díaz-Bertrana *et al.*, 2021; Omar *et al.*, 2022; Ravaioli *et al.*, 2022; Ghallab *et al.*, 2023). Christoffersen *et al.* (2015) concluíram que a zaragatoa é uma técnica menos sensível (33%), em comparação com a lavagem uterina (75%), mas mais específica (90% e 72%, respetivamente), embora no estudo realizado por Teixeira-Soares *et al.* (2022), a zaragatoa e escova de citologia apresentaram maior sensibilidade (84%) e especificidade (100%), relativamente à lavagem uterina (80% e 92%, respetivamente). Adicionalmente, a amostra obtida por estas técnicas representa a superfície do endométrio, o que pode interferir com a deteção de agentes responsáveis por infecções profundas, como no caso de *Streptococcus equi* subespécie *zoepidemicus* (Pisello *et al.*, 2019; Pascottini *et al.*, 2023).

Os resultados são também influenciados pela localização geográfica, exposição a antibióticos, condições de transporte e armazenamento das amostras, meio de cultura e de enriquecimento, condições de incubação e presença de biofilmes (Díaz-Bertrana *et al.*, 2021; Ravaioli *et al.*, 2022; Teixeira-Soares *et al.*, 2022). As bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* têm a capacidade de formar biofilmes, isto é, comunidades de bactérias aderentes à superfície e envolvidas por matrizes de biopolímeros, cuja identificação por métodos padrão de cultura é mais difícil (Díaz-Bertrana *et al.*, 2021; Morrell & Rocha, 2022; Nocera *et al.*, 2023). A ausência de crescimento na cultura bacteriológica, mas resultados positivos na citologia, podem também indicar a presença de uma endometrite não infecciosa (Díaz-Bertrana *et al.*, 2021).

Por conseguinte, é importante conjugar os meios disponíveis para obter um diagnóstico mais preciso e, assim, delinear um plano terapêutico eficaz (Rua *et al.*, 2018; Teixeira-Soares *et al.*, 2022).

A avaliação histopatológica de biópsia do endométrio é o método *gold standard* para o diagnóstico de endometrite, considerada positiva na presença de pelo menos dois a três neutrófilos por campo de ampliação total (Christoffersen *et al.*, 2015; Rua *et al.*, 2018). Permite avaliar a cronicidade das lesões e a presença de infiltrado de células inflamatórias em camadas profundas do endométrio. Contudo, uma única biópsia não representa a totalidade do órgão, pelo que a especificidade é baixa (26,1%), e não é rotineiramente usada na prática clínica devido ao custo e disponibilidade de outros métodos não invasivos (de Amorim *et al.*, 2016; Köhne *et al.*, 2020).

2.6.3. Tratamento

Em equinos e bovinos, o tratamento tem como base corrigir cirurgicamente eventuais defeitos anatómicos do trato reprodutivo e reduzir a resposta inflamatória e o conteúdo contaminante no útero, através de lavagens uterinas, normalmente com soluções não irritantes como cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% ou lactato de ringer (LR), 4 a 8 horas após a IA, seguidas da administração de agentes ecbólicos, como a oxitocina, a fim de estimular as contrações do miométrio e facilitar a *clearance* uterina (Köhne *et al.*, 2020; Morrell & Rocha, 2022; Ghallab *et al.*, 2023; Scarlet *et al.*, 2023).

A antibioterapia deve ser instituída de acordo com os resultados bacteriológicos e o teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA). Todavia, a sua eficácia pode ser reduzida quer pela presença de biofilmes, cuja matriz protege as bactérias envolventes da exposição aos antibióticos, razão pela qual podem estar associados a endometrite crónica, quer pelo aumento que se verifica de bactérias multirresistentes (MDR), devido ao uso indiscriminado de antibióticos (Pisello *et al.*, 2019; Díaz-Bertrana *et al.*, 2021; Omar *et al.*, 2022; Nocera *et al.*, 2023).

Em equinos, outras opções de tratamento menos comuns (Köhne *et al.*, 2020) incluem a infusão intrauterina de plasma rico em plaquetas, composto por fatores de crescimento com propriedades anti-inflamatórias e neovasculares, apresentando-se como uma opção eficaz na modulação da resposta inflamatória e melhoria da taxa de gestação, sem efeitos adversos associados (Reghini *et al.*, 2016; Pasch, Schmidt & King, 2021; Ghallab *et al.*, 2023); anti-inflamatórios não esteróides (AINES) seletivos para a ciclo-oxigenase-2, como o firocoxib, por não afetarem a contractilidade uterina nem a ovulação, em contraste aos AINES não seletivos, como a flunixinina meglumina (Friso *et al.*, 2019; Martínez-Boví, Plaza-

Dávila & Cuervo-Arango, 2023); e glucocorticóides (Christoffersen *et al.*, 2012; Wolf *et al.*, 2012; Arlas *et al.*, 2015).

2.7. Endometrite na espécie canina

Em cadelas, embora a bibliografia seja limitada, a endometrite tem-se revelado como uma doença uterina frequente, com impacto na fertilidade (Fontaine *et al.*, 2009; Christensen *et al.*, 2012; England, Moxon & Freeman, 2012a; England, Burgess & Freeman, 2012b; Freeman, Green & England, 2013b; Mir *et al.*, 2013; Gifford *et al.*, 2014; García Mitacek *et al.*, 2017; Praderio *et al.*, 2019; Bukowska *et al.*, 2020; Pascottini *et al.*, 2023). É caracterizada histologicamente pela presença de congestão vascular, edema do estroma e infiltração de células inflamatórias no endométrio, sendo definida como aguda ou subaguda com base na presença de infiltrado neutrofílico e/ou eosinofílico ou misto, respetivamente, ambas acompanhadas de hiperemia. A endometrite crónica é caracterizada por infiltração de linfócitos e/ou plasmócitos, associada a fibrose periglandular e intersticial (Mir *et al.*, 2013; Gifford *et al.*, 2014; García Mitacek *et al.*, 2017; Praderio *et al.*, 2019). Foi reportada uma maior prevalência de endometrite crónica em alguns estudos, o que parece estar associado à colheita de biópsias uterinas no final do diestro (Mir *et al.*, 2013; Gifford *et al.*, 2014; Praderio *et al.*, 2019). Já a endometrite eosinofílica esteve associada a perda fetal (Gifford *et al.*, 2014).

Em cadelas, a fisiopatologia desta doença permanece incerta (England *et al.*, 2021; Pascottini *et al.*, 2023). Tal como se verifica em éguas, a inseminação intrauterina em cadelas induz a acumulação de fluido e influxo de neutrófilos ao lúmen uterino, vasodilatação e aumento da frequência das contrações uterinas, possivelmente para a remoção do exsudato inflamatório, contaminantes bacterianos e de espermatozóides que não migraram para o oviducto (England *et al.*, 2012a; England, Russo & Freeman, 2013; England *et al.*, 2021).

Em cadelas com endometrite aguda, verificou-se uma elevada expressão da ciclooxigenase-2 em comparação com cadelas com o endométrio saudável (García Mitacek *et al.*, 2017). Assim, a endometrite induzida pela inseminação parece ter como causa um atraso na *clearance* uterina do estímulo inflamatório, particularmente em cadelas com hiperplasia quística do endométrio, nas quais observaram, após a IA, uma acumulação de fluido intrauterino às 48 horas (que em cadelas normais terminou às 24 horas), aumento da concentração de neutrófilos no lúmen uterino, bem como uma menor perfusão uterina. A acumulação prolongada de fluido intrauterino pode ser suscitada pela redução das contrações uterinas ou pela obstrução física, devido à presença dos quistos endometriais, à saída do fluido. Adicionalmente, tanto a presença de neutrófilos, como do fluido intrauterino, interfere com a adesão dos espermatozóides ao epitélio uterino, pelo que o efeito exacerbado destes

fatores, em cadelas com alterações uterinas, compromete a fertilidade (England *et al.*, 2012a; England *et al.*, 2012b; Freeman *et al.*, 2013b).

Ainda assim, a endometrite não é exclusiva de cadelas com hiperplasia quística do endométrio, uma vez que não foi verificada uma associação entre ambas as doenças noutros estudos (Gifford *et al.*, 2014; Praderio *et al.*, 2019; Bukowska *et al.*, 2020).

Infeções bacterianas persistentes, que ascendem pelo cérvix dilatado durante as fases de proestro e estro, constituem outra possível causa de endometrite (endometrite pós-estro) (England *et al.*, 2021), uma vez que, não só uma elevada prevalência (40% a 63,3%) foi identificada em cadelas não inseminadas aquando dos respetivos estudos, embora sem histórico reprodutivo conhecido (Christensen *et al.*, 2012; García Mitacek *et al.*, 2017; Praderio *et al.*, 2019; Bukowska *et al.*, 2020), como também a instituição de protocolos de antibioterapia em cadelas com endometrite resultou na melhoria da taxa de gestação (Fontaine *et al.*, 2009; England *et al.*, 2012a; England *et al.*, 2012b; Lyman *et al.*, 2018).

Para além destes casos de melhoria da performance reprodutiva com a administração de antibióticos, há apenas um relato de manejo terapêutico de endometrite crónica numa cadela (Lyman *et al.*, 2018). Baseando-se no que está descrito em equinos, estes autores verificaram que a administração sistémica de antibióticos e oxitocina, associada a lavagens uterinas com LR, foi eficaz na eliminação do fluido intrauterino, o que, após IA com sémen fresco, permitiu à cadela, incapaz de conceber há quatro ciclos reprodutivos, dar origem a uma ninhada.

Contudo, os isolados bacterianos obtidos de cadelas com endometrite não são concordantes com os resultados histopatológicos (Maksimović *et al.*, 2012; Mir *et al.*, 2013; Praderio *et al.*, 2019; Bukowska *et al.*, 2020). O mesmo se verificou para a citologia endometrial, colhida por zaragatoa, pelo que os autores concluíram que este meio não é prático para o diagnóstico de endometrite em cadelas clinicamente saudáveis (Praderio *et al.*, 2019; Bukowska *et al.*, 2020).

Posto isto, com o presente estudo, pretendeu-se identificar a prevalência de endometrite em cadelas clinicamente saudáveis e comparar os resultados obtidos por citologia e histopatologia do endométrio. Adicionalmente, procurou-se avaliar a frequência e caracterização fenotípica da microbiota uterina, para, deste modo, identificar possíveis fatores etiológicos e estabelecer medidas de prevenção, o que permitirá uma melhor comunicação com os tutores no manejo reprodutivo e na abordagem à infertilidade.

3. Material e Métodos

3.1. Caracterização da amostragem de estudo

No presente estudo foram incluídas 21 cadelas férteis de associação ($n=2$) e de tutela privada ($n=19$), clinicamente saudáveis, sem presença de neoplasia do trato reprodutivo nem de conteúdo intrauterino, nomeadamente piómetra, mucómetra, hidrómetra e hematómetra, que se apresentaram no AniCura Atlântico Hospital Veterinário ($n=19$) e no Hospital Veterinário da Universidade Lusófona – Centro Universitário Lisboa ($n=2$) para OVH ($n=4$) e OVE ($n=17$) previamente programadas, no período decorrido entre dezembro de 2022 e julho de 2023.

A cada tutor foi atribuído o Formulário de Consentimento (Apêndice A1), juntamente com um questionário (Apêndice A2) para registar a data de início dos sinais comportamentais que caracterizam o proestro e estro (período designado pelos tutores como “cio”), o intervalo entre cios, histórico de reprodução, estado de vacinação e desparasitação, tratamentos prévios e atuais e histórico de outras doenças.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona – Centro Universitário Lisboa.

3.2. Colheita e análise das amostras

3.2.1. Determinação da fase do ciclo éstrico

A fase do ciclo éstrico de cada cadela foi determinada através da data do último cio, do intervalo entre cios, da citologia vaginal e da medição da concentração sérica de progesterona.

3.2.1.1. Citologia vaginal

As amostras de citologia vaginal foram obtidas ao introduzir uma zaragatoa, húmida em água, na vagina e posterior rotação nas paredes laterais e dorsal. O esfregaço realizado foi seco ao ar, corado com coloração Diff-Quik® (QCA, Terragona, Espanha) e examinado ao microscópio ótico (Olympus CX21, Tóquio, Japão) quanto à presença de células não cornificadas (parabasais e intermédias), cornificadas (superficiais e escamosas anucleares), neutrófilos, eritrócitos e bactérias, nas ampliações de 400x e 1000x (Kustritz, 2020).

3.2.1.2. Progesterona

A amostra de sangue (1 ml) foi colhida da veia jugular ou da veia safena lateral para um tubo de heparina. De seguida, foi centrifugada durante 4 minutos a 3500 rotações por minuto (rpm) para medição da concentração sérica de progesterona.

A concentração de progesterona foi determinada por ensaio de fluorescência ligado a enzima (mini VIDAS®, bioMérieux Lda., Linda-a-Velha, Portugal), com recurso a um *kit* comercial (mini VIDAS® Progesterone Test Kit, bioMérieux).

3.2.2. Procedimento de lavagem uterina e biópsia uterina

Os animais foram pré-medicados com dexmedetomidina (Sedadex®; Dechra, Oudewater, Países Baixos; 5 µg/kg IM) e metadona (Semfortan®; Dechra, Bladel, Países Baixos; 0,3 mg/kg IM). A anestesia foi induzida com propofol (Propofol-®Lipuro 2%; Braun, Melsungen, Alemanha; 4 mg/kg IV, dose-efeito). Após intubação, a anestesia foi mantida com oxigénio e isoflurano (WATO EX-35 Vet; Mindray Animal Care, Hamburgo, Alemanha; 1,75%).

Cada cadela foi posicionada em decúbito ventral e a região vulvar foi higienizada com digluconato de clorexidina a 0,8% diluído em água. De seguida, o endoscópio (Uretero-*renoscópio* rígido, com ótica de 30°, comprimento de 35 cm e diâmetro de 9.5 Fr, Karl Storz®) foi introduzido na vagina até à visualização do cérvix. Com o insuflador, foi insuflado ar ambiente, em quantidade suficiente para permitir a dilatação da vagina e, assim, garantir uma melhor visualização do orifício cervical externo. Através do canal de trabalho do endoscópio, introduziu-se um cateter estéril até ao útero para proceder à lavagem uterina com LR estéril. O fluido obtido foi introduzido num copo estéril com tampa estanque para realização de cultura bacteriológica e citologia endometrial.

Posteriormente, o cateter foi removido e foi introduzida, por via transcervical, uma pinça de biópsia, com 1,8 mm de diâmetro e 180 cm de comprimento (Figura 3). Foram colhidas duas biópsias uterinas, a primeira foi introduzida num copo estéril de tampa estanque para cultura bacteriológica e a segunda numa cassette de histologia e fixada em solução de formalina a 10% num recipiente com tampa estanque para análise histopatológica.

No final da colheita das amostras cada cadela foi preparada para iniciar o procedimento cirúrgico.



Figura 3: Cateterização cervical com a pinça de biópsia (Original do autor).

3.2.3. Bacteriologia

Imediatamente após o procedimento de colheita, o fluido de lavagem uterina foi semeado em placas de Columbia agar com 5% de sangue de carneiro (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) e MacConkey agar (Biokar Diagnostics, França) e colocado em meio de enriquecimento *Brain Heart Broth* (BHIB, Biokar Diagnostics, França). A biópsia uterina destinada a bacteriologia foi colocada no meio de cultura BHIB que foi, posteriormente, semeado em Columbia agar com 5% de sangue de carneiro e em MacConkey agar. As respectivas placas e tubos foram incubados a 37°C durante 18 a 24 horas. As amostras, devidamente condicionadas e refrigeradas, foram transportadas para o laboratório e processadas de acordo com os métodos bacteriológicos mencionados previamente.

3.2.3.1. Teste de suscetibilidade a antibióticos

Nos isolados obtidos anteriormente foi testada a suscetibilidade a antibióticos pelo método de difusão do disco, interpretada de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Os discos de antibióticos (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) foram aplicados em placas com Agar Mueller-Hinton, inoculadas com uma suspensão de colónias de cultura pura a 0,5 da escala de McFarland, o que corresponde a uma concentração bacteriana entre 1 - 2 x 10⁸ UFC/ml.

Para bactérias pertencentes à ordem Enterobacterales, foram utilizados os seguintes antibióticos (Oxoid, Hampshire, Reino Unido): Amicacina (30 µg), Amoxicilina/Ácido clavulânico (30 µg), Ampicilina (10 µg), Cefotaxima (5 µg), Cefovecina (30 µg), Cefoxitina (30 µg), Ceftazidima (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Doxiciclina (30 µg), Enrofloxacina (5 µg), Ertapeneme (10 µg), Fosfomicina (200 µg), Gentamicina (10 µg), Imipeneme (10 µg),

Levofloxacina (5 µg), Meropeneme (10 µg), Minociclina (30 µg), Nitrofurantoína (300 µg), Tetraciclina (30 µg) e Trimetoprim/ Sulfametoxazol (25 µg).

Para *Enterococcus* spp., foram testadas a Ampicilina (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cloranfenicol (30 µg), Doxiciclina (30 µg), Enrofloxacin (5 µg), Eritromicina (15 µg), Estreptomicina (300 µg), Fosfomicina (200 µg), Gentamicina (120 µg), Levofloxacina (5 µg), Minociclina (30 µg), Nitrofurantoína (300 µg), Penicilina (10 µg) e Tetraciclina (30 µg).

Para *Streptococcus* spp., foram incluídos os antibióticos Cefalotina (30 µg), Cefovecina (30 µg), Clindamicina (2 µg) e os mesmos antibióticos para *Enterococcus* spp., com exceção da Minociclina (30 µg).

No TSA para *Staphylococcus* spp. foram usados os antibióticos Ácido fusídico (10 µg), Amoxicilina/Ácido clavulânico (30 µg), Ampicilina (10 µg), Cefalotina (30 µg), Cefovecina (30 µg), Cefoxitina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Clindamicina (2 µg), Doxiciclina (30 µg), Enrofloxacin (5 µg), Eritromicina (15 µg), Gentamicina (10 µg), Levofloxacina (5 µg), Minociclina (30 µg), Nitrofurantoína (300 µg), Oxacilina (1 µg), Tetraciclina (30 µg) e Trimetoprim/Sulfametoxazol (25 µg).

3.2.3.2. Rastreio da atividade de carbapenemases nas Enterobacterales

Para rastreio da atividade de carbapenemases nas Enterobacterales, foi realizado o teste MAST® CAT-ID (D71C, Mastgroup, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

3.2.3.3. Identificação da espécie dos isolados bacterianos

O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído de amostras em culturas puras, conforme protocolos definidos no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona – Centro Universitário Lisboa para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [adaptado do Laboratório de Referência da União Europeia em Resistência Antimicrobiana (<https://www.eurl-ar.eu>)], de modo a identificar as respetivas espécies bacterianas por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) convencional. Esta técnica *in vitro* permite amplificar sequências específicas do DNA em estudo para gerar cópias dos fragmentos de interesse (Sreejith *et al.*, 2018). A deteção destes produtos de PCR foi realizada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose (Nzytech, Lisboa, Portugal), que consiste na separação dos fragmentos de DNA, de acordo com o seu peso molecular em pares de bases (pb), durante a migração numa matriz de gel após aplicar uma determinada corrente elétrica (Ziraldó *et al.*, 2019).

As misturas de reação para a realização do PCR no termociclador (Biometra Tone Series, Analytik jena Alemanha) eram compostas por água MiliQ esterilizada, 12.5 µL de Supreme NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYtech, Portugal), 0,5 µM de cada oligonucleótido e 1,5 µL de DNA, perfazendo um volume final de 25 µL. Foi usado um controlo positivo (estirpe previamente identificada e sequenciada) e um controlo negativo.

Para a confirmação da espécie *Escherichia coli* foi realizado um simplex PCR (adaptado de Doumith *et al.*, 2012) para a amplificação do gene *gadA*, característico desta espécie (Tabela 2). As condições de hibridação utilizadas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Caracterização dos oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para a identificação da espécie *Escherichia coli* (Adaptado de Doumith *et al.*, 2012).

Gene alvo	Nome do oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5'→3')	Fragmento ampliado	Duração de hibridação	Temperatura de hibridação
<i>gadA</i>	gadAF	GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG	373 pb	30 s	65°C
	gadAR	GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC			

Para a confirmação das espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* foi realizado um multiplex PCR [adaptado do Laboratório de Referência da União Europeia em Resistência Antimicrobiana (<http://www.crl-ar.eu>)] para a amplificação dos genes *ddlE faecalis* e *ddlE faecium*, característicos de cada espécie respetivamente (Tabela 3). As condições de hibridação utilizadas estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização dos oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para a identificação das espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (Adaptado do Laboratório de Referência da União Europeia em Resistência Antimicrobiana).

Gene alvo	Nome do oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5'→3')	Fragmento ampliado	Duração de hibridação	Temperatura de hibridação
<i>ddlE faecalis</i>	E1	ATCAAGTACAGTTAGTCTT	941 pb	30 s	65°C
	E2	ACGATTCAAAGCTAACTG			
<i>ddlE faecium</i>	F1	GCAAGGCTTCTTAGAGA	550 pb		
	F2	CATCGTGTAAGCTAACTTC			

A análise de cada produto de reação, obtido previamente por PCR, foi efetuada por migração em gel de agarose (Nzytech, Lisboa, Portugal) 1,5% (p/v) em tampão tris-borato-EDTA (TBE). Foi utilizado o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder V 50-1000pb

(NZYtech, Portugal) e o resultado foi visualizado por meio de um transluminador ultravioleta (UVView™ Mini Tansilluminator, Bio-rad, França).

Para a identificação das espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas para as quais não foi possível realizar PCR, os isolados foram enviados e processados para um laboratório externo para a respetiva identificação em VITEK® MS (Biomerieux, França).

3.2.4. Citologia endometrial

Após a colheita de amostra para bacteriologia, o restante fluido de lavagem uterina foi introduzido num tubo de EDTA e centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm. Com o sedimento, foram realizados esfregaços, por meio da técnica linear e de *squash*, corados com Hemacolor® (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha).

Ao microscópio ótico (Olympus CX21, Tóquio, Japão), nas ampliações de 400x e 1000x, foram contabilizadas 200 células para determinar a proporção de neutrófilos relativamente às células epiteliais. A presença de inflamação foi definida na presença de uma concentração de neutrófilos \geq a 2% (Praderio *et al.*, 2019).

3.2.5. Histopatologia

Todas as biópsias foram processadas para análise histopatológica de rotina, isto é, inclusão em parafina, cortes em secções de 3 μ M e coloração com hematoxilina-eosina. Ao microscópio ótico (Olympus CX21, Tóquio, Japão), pesquisou-se a presença de infiltrado celular inflamatório (neutrófilico, eosinofílico e linfocítico). O endométrio normal foi definido quando constituído por mucosa com pregas longitudinais, estroma, glândulas endometriais e epitélio intacto e aderido à membrana basal, sem presença de infiltrado celular inflamatório (Praderio *et al.*, 2019).

As imagens foram obtidas com o NanoZoomer-SQ Digital slide scanner C13140-01 (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan), por meio do software NDP.view2 Image viewing (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan).

4. Resultados

4.1. Caracterização da amostra

Todas as cadelas apresentavam-se clinicamente saudáveis, sem presença de doenças concomitantes descritas pelos tutores. O intervalo de peso variou entre 4,05 Kg e 41,5 Kg e a idade entre os 9 meses e os 5 anos e 3 meses, com uma média de 2,26 anos ($DP=1,31$). Por sua vez, 71% ($n=15$) das cadelas apresentavam idades compreendidas entre

os 9 meses e os 3 anos de idade e 29% ($n=6$) apresentavam mais de 3 anos. A população em estudo é constituída por um grupo sem raça definida ($n=7$) e um total de 11 raças: Pastor Alemão ($n=3$); Bichon Maltês ($n=2$); American Staffordshire Terrier ($n=1$); Border Collie ($n=1$); Cane Corso ($n=1$); Dogue de Bordéus ($n=1$); Fox Terrier ($n=1$); Jack Russel Terrier ($n=1$); Labrador ($n=1$); Pastor Branco Suíço ($n=1$); Whippet ($n=1$).

A maioria das cadelas apresentava-se devidamente vacinada e desparasitada, com exceção das duas cadelas de associação (9,5%). Não foi administrada antibioterapia nos 6 meses que antecederam a colheita das amostras em qualquer cadela. Não foram administrados glucocorticóides em nenhuma cadela nos 3 meses anteriores à colheita das amostras. Até à data, nenhuma cadela foi previamente medicada com progestagénios.

Previamente ao estudo, 4,8% ($n=1$) das cadelas teve um parto, sem histórico de infertilidade, embora dois dos oito cachorros da ninhada tenham morrido 2 dias após o parto, sem acesso a qualquer diagnóstico ou causa de morte. Das restantes cadelas, 85,7% ($n=18$) nunca foram inseminadas e 9,5% ($n=2$) não tinham histórico reprodutivo conhecido. Em 4,8% ($n=1$) das cadelas, não foi possível a colheita de amostras por impossibilidade de cateterização transcervical, possivelmente devido à presença de um defeito anatómico congénito no trato genital, embora o mesmo não tenha sido evidenciado durante a vaginoscopia.

O volume de fluido de lavagem uterina colhido foi entre 0,3 e 2 ml, independente do volume de LR instilado, que variou entre 1,5 e 20 ml consoante o peso do animal, a visualização de refluxo cervical e a facilidade em colher a amostra. O volume aspirado foi suficiente para o processamento das amostras para a análise bacteriológica e para a citologia endometrial.

4.2. Fase do ciclo éstrico

Tomando em consideração a análise dos dados sobre a data do último cio e o intervalo entre cios de cada cadela e os resultados obtidos pela medição da concentração sérica de progesterona e pela citologia vaginal, determinou-se que, no dia de cada cirurgia eletiva, 76% ($n=16$) das cadelas encontravam-se em proestro e 24% ($n=5$) em anestro.

Foram identificadas células espumosas (*foam cells*) na citologia vaginal de uma cadela em anestro (Figura 4). Observou-se lise celular em 24% ($n=5$) das cadelas e alteração da tonalidade dos esfregaços para azul, possivelmente pela proximidade com solução de formalina a 10%, em 14% ($n=3$) das cadelas.

Uma elevada proporção de neutrófilos, compatível com vaginite, foi visualizada em 14% ($n=3$) das cadelas em proestro. Numa cadela em fase de proestro foi possível identificar a presença de diplococos fagocitados na citologia vaginal (Figura 4).

Nas cadelas consideradas em proestro, a concentração sérica média de progesterona foi de 1,09 ng/ml ($DP=0,44$) e nas cadelas em anestro foi de 0,56 ng/ml ($DP=0,20$).

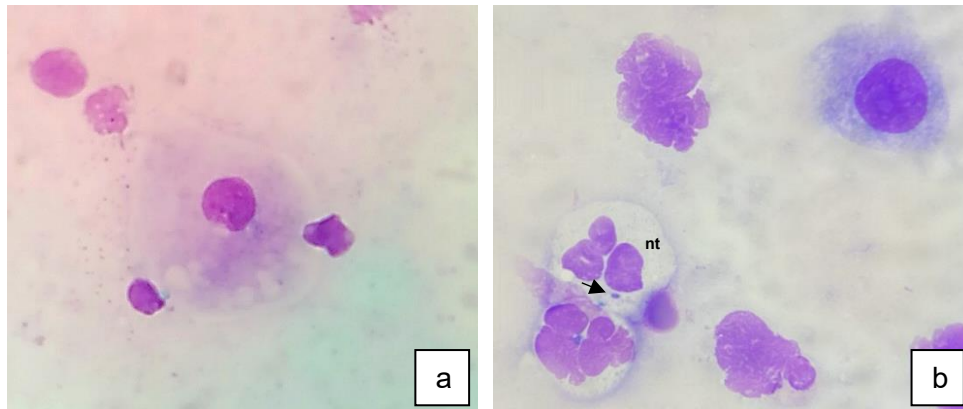


Figura 4: Citologia vaginal: **a)** Visualização de uma célula espumosa (*foam cell*), com vacúolos citoplasmáticos e núcleo excêntrico (100X, Diff-Quik®); **b)** Visualização de diplococo (seta) fagocitado por um neutrófilo (nt) (100X, Diff-Quik®) (Originalis do autor).

4.3. Histopatologia

Uma vez que a técnica de colheita das amostras foi realizada sem visualização do útero, não foi possível identificar a presença de alterações macroscópicas para direcionar a pinça de biópsia.

Nas amostras de biópsia uterina foi possível identificar endométrio normal (Figura 5) em 65% das cadelas ($n=13$). Em todas estas, constatou-se a presença de artefactos de esmagamento, que são causados pela pinça no momento da biópsia e induzem a alteração da morfologia celular (Figura 6). Quinze por cento ($n=3$) das amostras apresentavam miométrio, das quais em 66,7% ($n=2$) era também visível tecido endometrial. Das restantes amostras, 15% ($n=3$) apresentaram apenas tecido adiposo, indicativo de rutura uterina, e 10% ($n=2$) apresentaram apenas coágulo sanguíneo. Devido à presença de artefacto de esmagamento, não foi possível identificar o tipo de tecido em 5% ($n=1$) das amostras.

Nas biópsias uterinas com endométrio identificado (65%; $n=13$), não foram visualizados infiltrados de células inflamatórias, pelo que nenhuma cadela foi classificada histopatologicamente com endometrite.

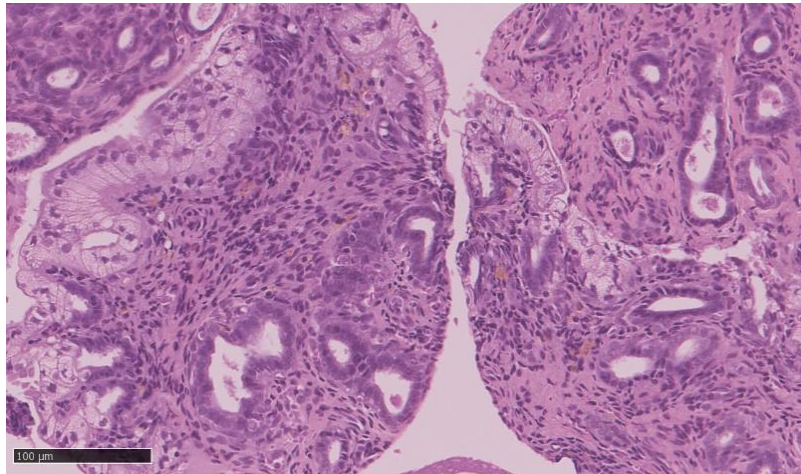


Figura 5: Biópsia uterina na qual é possível identificar os constituintes do endométrio, incluindo glândulas endometriais, bem diferenciadas e suportadas por um estroma laxo (20X, H&E) (Original do autor).

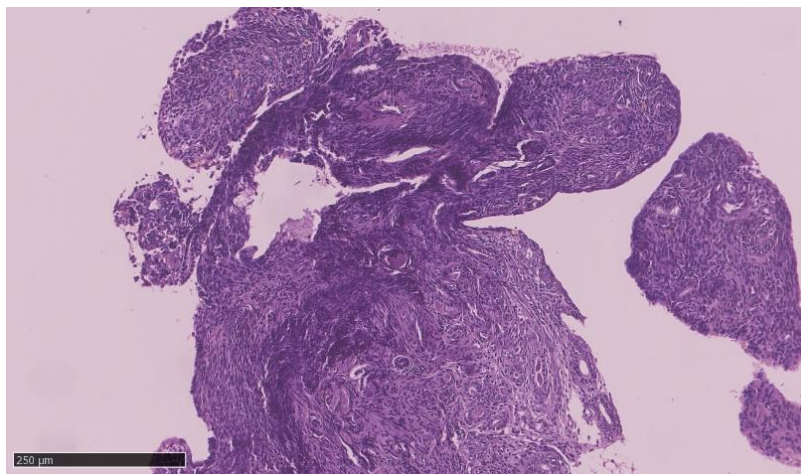


Figura 6: Presença de artefactos de esmagamento em toda a amostra, associados à colheita por via transcervical (10X, H&E) (Original do autor).

4.4. Citologia endometrial

Na citologia endometrial foram visualizadas células epiteliais, leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos), eritrócitos e debris celulares (Figura 7).

Das 20 cadelas, 35% ($n=7$) apresentaram resultados indicativos de inflamação, em 20% ($n=4$) a concentração de neutrófilos foi inferior a 2% e em 45% ($n=9$) não foram visualizados neutrófilos nos campos avaliados ao microscópio ótico.

Relativamente à fase do ciclo éstrico, 71,4% ($n=5$) das amostras compatíveis com endometrite foram obtidas de cadelas em proestro e 28,6% ($n=2$) de cadelas em anestro.

Das sete amostras compatíveis com endometrite, 71,4% ($n=5$) foram colhidas de cadelas com uma cultura positiva para crescimento bacteriano.

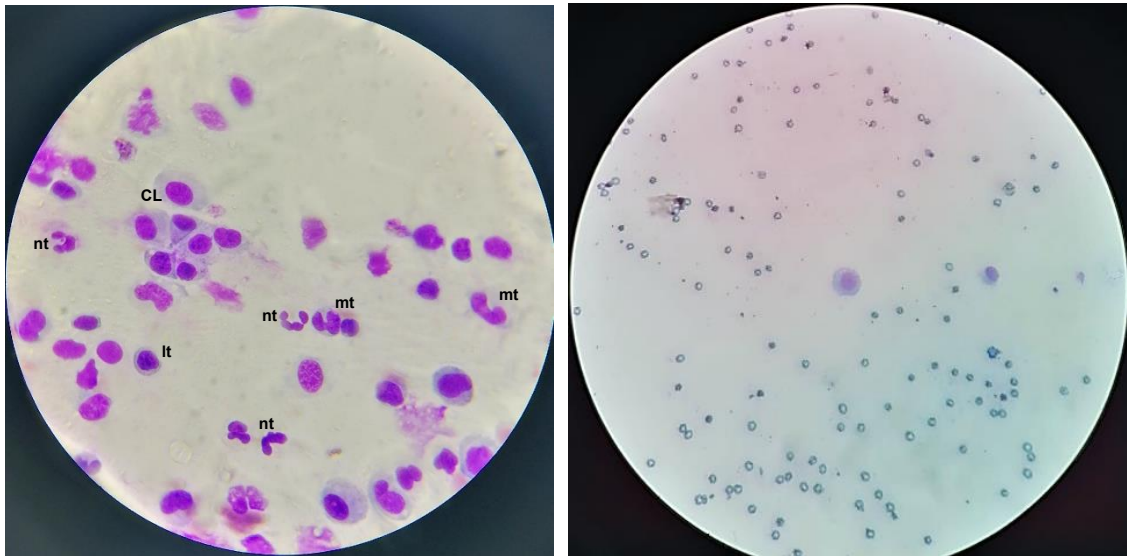


Figura 7: Citologia endometrial: **a)** Presença de células epiteliais (CL), neutrófilos (nt), linfócitos (lt) e monócitos (mt) (100X, Hemacolor®); **b)** Presença de uma célula epitelial, com contaminação por eritrócitos (40X, Hemacolor®) (Originais do autor).

4.5. Análise Bacteriológica

Das 20 cadelas, 65% ($n=13$) apresentaram resultados positivos para a presença de bactérias Gram-positivas ($n=13$) e Gram-negativas ($n=7$). Os agentes bacterianos identificados incluíram: *Enterococcus faecalis* ($n=5$), *Enterococcus canintestini* ($n=3$), *Enterococcus faecium* ($n=1$), *Staphylococcus pseudintermedius* ($n=3$), *Pantoea agglomerans* ($n=2$), *Enterobacter cloacae* ($n=1$), *Enterobacter hormaechei* ($n=1$), *Escherichia coli* ($n=1$), *Klebsiella oxytoca* ($n=1$), *Serratia marcescens* ($n=1$) e *Streptococcus cani* ou *Streptococcus dysgalactiae* ($n=1$) (Figura 8). Relativamente à identificação da bactéria *Streptococcus cani* ou *Streptococcus dysgalactiae*, o equipamento VITEK® MS (Biomérieux, França) assinalou um alto score de identificação para ambas as espécies, não sendo, por isso, uma identificação exata.

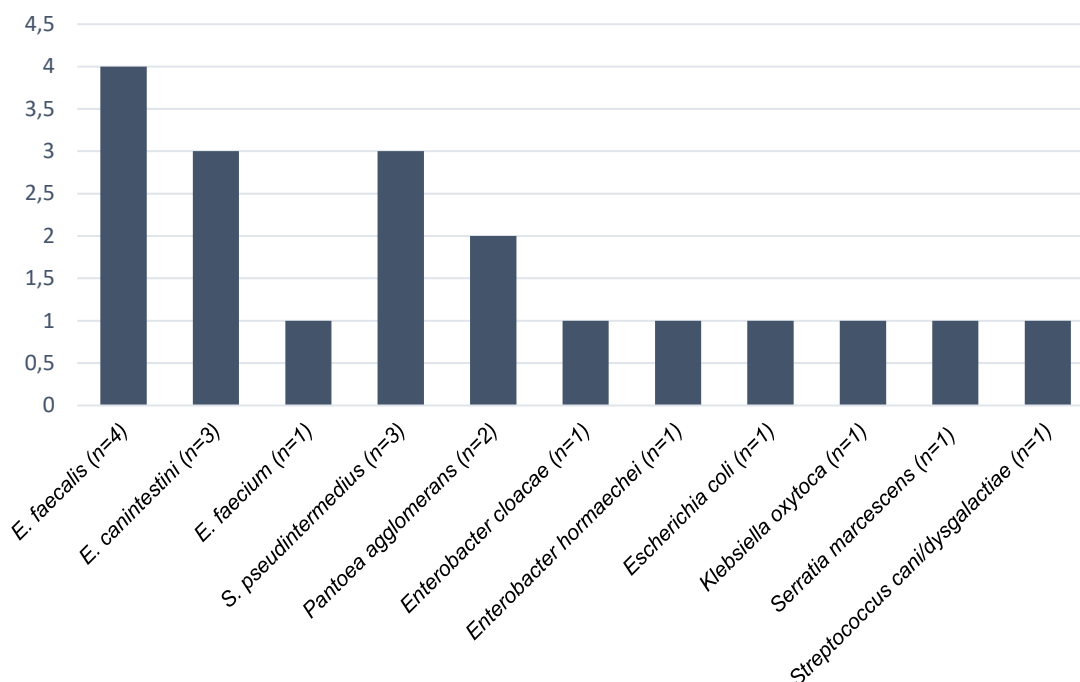


Figura 8: Representação gráfica da distribuição dos agentes bacterianos obtidos nas amostras colhidas via lavagem uterina e biópsia uterina de cadelas clinicamente saudáveis.

Nas amostras de lavagem uterina foram obtidos isolados bacterianos em 30% das cadelas ($n=6/20$) (Figura 9), nomeadamente *Staphylococcus pseudintermedius* ($n=2$), *Enterococcus canintestini* ($n=1$), *Enterococcus faecalis* ($n=1$), *Enterococcus faecium* ($n=1$), *Pantoea agglomerans* ($n=1$) e *Streptococcus cani* ou *Streptococcus dysgalactiae* ($n=1$). Oitenta e três por cento ($n=5$) das amostras apresentaram crescimento puro e 17% ($n=1$) apresentou crescimento misto de bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus pseudintermedius*). O crescimento bacteriano a partir do fluido de lavagem uterina foi negativo em 70% ($n=14$) das cadelas.

Por cultura de biópsia uterina, foi detetada a presença de bactérias em 45% das cadelas ($n=9/20$) (Figura 9): *Enterococcus faecalis* ($n=4$), *Enterococcus canintestini* ($n=2$), *Enterobacter cloacae* ($n=1$), *Enterobacter hormaechei* ($n=1$), *Escherichia coli* ($n=1$), *Klebsiella oxytoca* ($n=1$), *Pantoea agglomerans* ($n=1$), *Serratia marcescens* ($n=1$) e *Staphylococcus pseudintermedius* ($n=1$). Destas amostras, 67% ($n=6$) apresentaram crescimento puro e 33% ($n=3$) apresentaram crescimento misto para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Através da análise deste tipo de amostra, não foi identificado crescimento bacteriano em 55% ($n=11$) das cadelas.

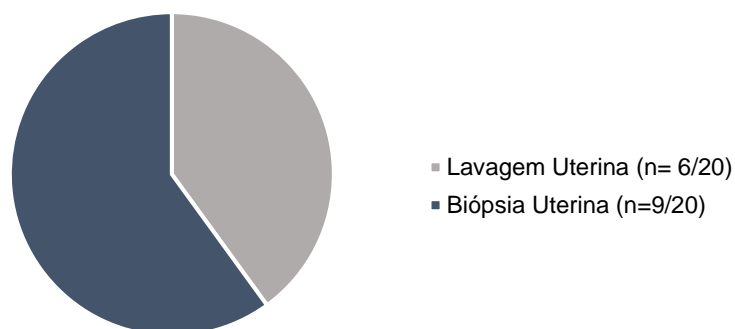


Figura 9: Representação gráfica do número de cadelas que apresentaram crescimento bacteriano por técnica de colheita de amostra (lavagem uterina e biópsia uterina).

Apenas em 10% ($n=2$) das cadelas foram obtidos isolados bacterianos pelas duas técnicas realizadas para a colheita de amostras. Uma cadela apresentou crescimento de *Staphylococcus pseudintermedius* no fluido de lavagem uterina, *Enterobacter hormaechei* na biópsia uterina e *Enterococcus faecalis* em ambas as amostras. A segunda apresentou crescimento de *Enterococcus faecium* no fluido de lavagem uterina e *Pantoea agglomerans* na biópsia uterina.

Das cadelas em proestro ($n=15$), em 60% ($n=9$) foram colhidas amostras que apresentaram crescimento bacteriano. Em cinco cadelas em anestro, 80% ($n=4$) estiveram associadas a crescimento bacteriano, sendo que em todas foram isoladas bactérias pertencentes ao género *Enterococcus*.

4.5.1. Teste de suscetibilidade a antibióticos

A suscetibilidade de cada antibiótico para os isolados da ordem Enterobacterales ($n=7$) (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea agglomerans*, *Serratia marcescens*) e dos géneros *Enterococcus* ($n=9$) e *Staphylococcus* ($n=3$), estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6, respetivamente.

Tabela 4: Teste de suscetibilidade a antibióticos para os isolados da ordem Enterobacterales.

Antibiótico	Sensível (%)	Intermédio (%)	Resistente (%)
Amicacina (30 µg)	85,7	0	14,3
Amoxicilina/Ácido clavulânico (30 µg)	42,9	14,3	42,8
Ampicilina (10 µg)	42,9	0	57,1
Cefotaxima (5 µg)	71,4	14,3	14,3

Cefoxitina (30 µg)	42,9	14,3	42,8
Ceftazidima (10 µg)	71,4	14,3	14,3
Ciprofloxacina (5 µg)	71,4	28,6	0
Doxiciclina (30 µg)	42,9	0	57,1
Enrofloxacina (5 µg)	71,4	28,6	0
Ertapeneme (10 µg)	100	0	0
Fosfomicina (200 µg)	85,7	14,3	0
Gentamicina (10 µg)	100	0	0
Imipeneme (10 µg)	100	0	0
Levofloxacina (5 µg)	100	0	0
Meropeneme (10 µg)	100	0	0
Minociclina (30 µg)	42,9	0	57,1
Nitrofurantoína (300 µg)	57,1	14,3	28,6
Tetraciclina (30 µg)	42,9	0	57,1
Trimetoprim/Sulfametoxazol (25 µg)	42,9	0	57,1
Cefovecina (30 µg)	57,1	14,3	28,6

Tabela 5: Teste de suscetibilidade a antibióticos para os isolados de *Enterococcus* spp.

Antibiótico	Sensível (%)	Intermédio (%)	Resistente (%)
Ampicilina (10 µg)	88,9	0	11,1
Ciprofloxacina (5 µg)	11,1	77,8	11,1
Cloranfenicol (30 µg)	100	0	0
Doxiciclina (30 µg)	77,8	11,1	11,1
Enrofloxacina (5 µg)	33,3	44,5	22,2
Eritromicina (15 µg)	33,3	55,6	11,1
Estreptomicina (300 µg)	88,9	11,1	0
Fosfomicina (200 µg)	100	0	0
Gentamicina (120 µg)	100	0	0
Levofloxacina (5 µg)	66,7	33,3	0
Minociclina (30 µg)	66,7	22,2	11,1
Nitrofurantoína (300 µg)	77,8	11,1	11,1
Penicilina (10 µg)	100	0	0
Tetraciclina (30 µg)	66,7	11,1	22,2

Tabela 6: Teste de suscetibilidade a antibióticos para os isolados de *Staphylococcus* spp.

Antibiótico	Sensível (%)	Intermédio (%)	Resistente (%)
Ácido fusídico (10 µg)	100	0	0
Amoxicilina/Ácido clavulânico (30 µg)	100	0	0
Ampicilina (10 µg)	100	0	0
Cefalotina (30 µg)	100	0	0
Cefovecina (30 µg)	100	0	0
Cefoxitina (30 µg)	100	0	0
Ciprofloxacina (5 µg)	100	0	0
Clindamicina (2 µg)	100	0	0
Doxiciclina (30 µg)	33,3	0	66,7
Enrofloxacina (5 µg)	66,7	33,3	0
Eritromicina (15 µg)	66,7	33,3	0
Gentamicina (10 µg)	100	0	0
Levofloxacina (5 µg)	100	0	0
Minociclina (30 µg)	33,3	66,7	0
Nitrofurantoína (300 µg)	100	0	0
Oxacilina (1 µg)	100	0	0
Tetraciclina (30 µg)	66,7	0	33,3
Trimetoprim/Sulfametoxazol (25 µg)	100	0	0

Relativamente ao *Streptococcus cani* ou *Streptococcus dysgalactiae* (n=1), esta bactéria apresentou apenas resistência à Enrofloxacina.

Todos os isolados MDR, isto é, resistência a pelo menos três classes diferentes de antibióticos, pertencem à ordem Enterobacterales, nomeadamente as bactérias *Enterobacter cloacae* (n=1), *Enterobacter hormaechei* (n=1), *Klebsiella oxytoca* (n=1) e *Serratia marcescens* (n=1), sendo que as últimas duas foram obtidas da mesma cadela.

5. Discussão

Relativamente à citologia vaginal, revelou-se difícil interpretar os resultados em certas cadelas, quanto à diferenciação entre proestro e anestro. Como tal, a citologia vaginal trata-se de uma técnica algo subjetiva, limitada pela experiência do operador e pela técnica

de colheita, pelo que a sua conjugação com a concentração sérica de progesterona e a informação sobre a história do último cio e intervalo entre cios facilitou a determinação da fase do ciclo éstrico, à semelhança do que é aconselhado por outros autores (Olğaç *et al.*, 2017; Arlt, 2018; Reckers *et al.*, 2022).

A endometrite tem um grande impacto na reprodução de equinos e bovinos. Não obstante, os estudos sobre esta doença em cadelas são, ainda, limitados. A fisiopatologia nesta espécie, embora não esteja totalmente esclarecida, pode estar associada à cópula ou IA, resultando num estado inflamatório que perdura até à implantação embrionária (Praderio *et al.*, 2019; England *et al.*, 2021). Contudo, a identificação de endometrite em cadelas não sujeitas a inseminação (Christensen *et al.*, 2012; García Mitacek *et al.*, 2017; Praderio *et al.*, 2019; Bukowska *et al.*, 2020) favorece a hipótese de que a dilatação cervical, durante o proestro e estro, constitui uma porta de entrada para infeções uterinas ascendentes, inclusive microrganismos residentes da microbiota vaginal, o que promove o estabelecimento desta doença por disbiose uterina e/ou comprometimento da função imune inata (endometrite pós-estro) (England *et al.*, 2021; Pascottini *et al.*, 2023). Outro fator de risco inclui o atraso no processo de *clearance* uterina, necessária à remoção atempada do exsudato inflamatório, bactérias e outros produtos inflamatórios, seja por redução da contractilidade miometrial, como descrito em éguas, ou pela presença de anomalias ou doenças, como a hiperplasia quística do endométrio (England *et al.*, 2012a; Freeman *et al.*, 2013b; Ghallab *et al.*, 2023).

Tendo em conta que em bovinos de aptidão leiteira a endometrite ocorre quase exclusivamente no período após o parto, devido à colonização uterina por bactérias e redução da função imunitária associada ao *stress* metabólico, Pascottini *et al.* (2023) propõem que a endometrite pós-parto em cadelas seja uma potencial causa, principalmente em situações de parto prolongado, distócia e retenção placentária. Embora em cadelas estes casos estejam associados a metrite, por lesão de todas as camadas uterinas, estes autores sugerem que a infeção bacteriana e trauma do útero possa instaurar adicionalmente uma endometrite que, quando subclínica, pode persistir até ao estro subsequente.

Em alguns estudos foi identificada uma maior prevalência de endometrite crónica (Mir *et al.*, 2013; Gifford *et al.*, 2014; Praderio *et al.*, 2019). Para além de uma possível origem pós-parto, esta pode estar também associada a casos de endometrite pós-estro ou induzida pela inseminação, que continua a subsistir até ao estro do ciclo seguinte (Pascottini *et al.*, 2023). Todavia, apenas um caso de endometrite persistente por vários ciclos reprodutivos, associada a falha em conceber, está descrito em cadelas (Lyman *et al.*, 2018).

Uma vez que a histopatologia é o método *gold standard* para o diagnóstico de endometrite, os resultados obtidos por este meio de diagnóstico, no presente estudo, indicam

que a endometrite não está presente em cadelas clinicamente saudáveis, o que não vai de encontro com os resultados documentados em outros artigos, nos quais identificam a endometrite como uma doença uterina prevalente (Christensen *et al.*, 2012; Mir *et al.*, 2013; Gifford *et al.*, 2014; García Mitacek *et al.*, 2017; Praderio *et al.*, 2019; Bukowska *et al.*, 2020). A diferença verificada nos resultados poderá estar associada a vários fatores, alguns dos quais descritos em seguida.

Durante 7 meses, foram colhidas amostras uterinas de 20 cadelas. Embora o tamanho da população incluída seja semelhante ao de outros estudos nos quais identificaram uma prevalência de endometrite de 33,3% e 50% (Christensen *et al.*, 2012; Mir *et al.*, 2013), apenas em 65% das cadelas ($n=13$) foi possível obter biópsias com tecido endometrial e, por isso, válidas para obter um diagnóstico histopatológico.

A média de idades das cadelas no presente estudo foi de 2,26 anos ($DP=1,31$), sendo que 71% ($n=15$) apresentavam idade inferior a 3 anos, o que pode contribuir, adicionalmente, para a falta de casos positivos. De facto, Bukowska *et al.*, (2020) identificaram que a maioria das cadelas estudadas com menos de 5 anos apresentava endométrio normal, enquanto todas as cadelas com idade superior apresentavam doença uterina, nomeadamente endometrite e/ou hiperplasia quística do endométrio. No presente estudo, apenas 10% ($n=2$) das cadelas tinham 5 anos, ambas sem tecido endometrial visível nas respetivas biópsias uterinas, pelo que não foi possível obter um diagnóstico para a presença ou não de endometrite. Noutros estudos que reportaram uma prevalência elevada de endometrite, a média das idades das cadelas foi igualmente superior ao deste estudo (Mir *et al.*, 2013; Gifford *et al.*, 2014). A incidência de hiperplasia quística do endométrio aumenta com a idade, devido aos efeitos proliferativos da progesterona ao longo de ciclos éstricos sucessivos, principalmente a partir dos 6 anos de idade (Moxon, Whiteside & England, 2016; Woźna-Wysocka *et al.*, 2021). Neste estudo, todas as cadelas tinham uma idade inferior a 6 anos no momento da colheita das amostras, o que pode explicar o facto de nenhuma cadela ter sido diagnosticada com hiperplasia quística do endométrio, embora seja considerada uma das doenças uterinas mais comuns nesta espécie (Woźna-Wysocka *et al.*, 2021). Não obstante, um elevado número de casos de endometrite foi também identificado em cadelas com uma média de idades semelhante ao presente estudo e entre os grupos com e sem a doença (García Mitacek *et al.*, 2017; Praderio *et al.*, 2019).

A fase do ciclo éstrico em que as cadelas se encontravam no momento da colheita das amostras parece ser também um fator determinante. O diestro foi a fase com maior número de casos positivos para endometrite (Christensen *et al.*, 2012; Mir *et al.*, 2013; Gifford *et al.*, 2014). Já García Mitacek *et al.* (2017) e Praderio *et al.* (2019) reportaram uma maior

prevalência de endometrite comparativamente com outros estudos, possivelmente por terem incluído apenas cadelas em diestro. Enquanto o estradiol contribui para a manutenção do sistema imunitário, ao estimular a ação de células imunitárias e a migração de neutrófilos (Sugiura *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2014), elevados níveis de progesterona estão associados a uma diminuição de linfócitos T, neutrófilos, macrófagos e células *Natural Killer* (Bishop *et al.*, 2015; Pires & Payan-Carreira, 2015). Assim, o estradiol parece ter um papel importante no controlo de infeções uterinas durante o proestro e estro, ao passo que a progesterona exerce um efeito imunossupressor, possivelmente para impedir a rejeição materna do embrião e do feto durante a gestação (Bishop *et al.*, 2015; Pires & Payan-Carreira, 2015). Desta forma, a produção aumentada de progesterona durante o diestro pode favorecer a identificação de endometrite neste período. Por conseguinte, a ausência de cadelas em diestro no presente estudo pode ter influenciado os resultados obtidos. Por outro lado, um outro estudo verificou que o diagnóstico de endometrite não foi influenciado pela fase do ciclo éstrico, no qual a doença foi identificada em cadelas tanto em diestro como em anestro, proestro e estro (Bukowska *et al.*, 2020).

O acesso ao útero, por via transcervical e por laparotomia, de cadelas em diestro esteve associado ao aparecimento de casos de piómetra, possivelmente devido à introdução iatrogénica de bactérias num ambiente sensível e propício ao desenvolvimento bacteriano sob a influência da progesterona (Fontaine *et al.*, 2009; Christensen *et al.*, 2012; Mir *et al.*, 2013).

A via realizada para a colheita das amostras uterinas, isto é, por cateterização cervical, está também associada a certas limitações. Apesar da biópsia uterina permitir a colheita de ambas as camadas do endométrio, a visualização de todo o procedimento está restrita à vagina e orifício cervical externo. Como tal, não foi possível direcionar cada biópsia uterina para regiões do endométrio macroscopicamente alteradas. Além disso, foi colhida apenas uma biópsia uterina por animal para avaliação histopatológica, de dimensão bastante reduzida, e, como tal, não é representativa de todo o órgão. Assim, com esta técnica, o operador está sujeito a falhar zonas focais de inflamação, pelo que a ausência de casos positivos pode ser atribuída à região biopsiada. Ademais, o procedimento esteve associado a artefactos de esmagamento nas amostras para análise histopatológica, originados pela pinça de biópsia aquando da colheita. Estes artefactos afetam a arquitetura normal do tecido obtido, sendo que numa das amostras a alteração da morfologia celular impossibilitou a identificação da camada uterina. Por outro lado, Christensen *et al.* (2012), ao compararem biópsias uterinas obtidas por via transcervical e após OVH, não detetaram diferenças no diagnóstico de lesões uterinas, como endometrite. A diferença destes resultados para os do presente estudo pode estar no facto destes autores terem realizado três biópsias, o que

permitiu o aumento da sensibilidade uma vez que a lesão diagnosticada não esteve presente simultaneamente nas três amostras colhidas do mesmo útero. Tal como neste estudo, o miométrio foi identificado nas amostras colhidas. Ainda assim, um maior número de amostras (91,5%), obtidas por via transcervical, apresentaram boa qualidade, comparativamente com o que foi obtido no presente estudo (65%). No decorrer desta investigação, foram colhidas três biópsias uterinas por animal, a primeira para bacteriologia, a segunda para histopatologia e a terceira para pesquisa de mediadores inflamatórios por *Real-time* PCR (amostras congeladas a -80°C para futura investigação). Nem sempre foi possível realizar a terceira biópsia em todas as cadelas, devido a hemorragia secundária ao trauma das restantes biópsias ou pela dificuldade sentida na colheita das anteriores, pelo que realizar mais biópsias para histopatologia, embora importante, não foi exequível.

Em 21 cadelas, previamente inseminadas, com história de incapacidade em ficar gestante ou perda de gestação, foram colhidas amostras uterinas após OVH para avaliação histopatológica. A endometrite foi a lesão mais frequente, a par de fibrose com degeneração das glândulas endometriais, em 33,3% das cadelas (Mir *et al.*, 2013). Noutra investigação, a endometrite foi a doença mais observada (42,6%) em 399 cadelas que, maioritariamente por motivos de incapacidade em ficar gestante, morte fetal e reduzido tamanho da ninhada, foram submetidas a biópsia uterina para determinar a causa (Gifford *et al.*, 2014). A endometrite foi igualmente a alteração uterina mais predominante (54%), num estudo que envolveu 41 cadelas que nunca ficaram gestantes, embora não se saiba se por infertilidade ou porque nunca foram inseminadas (Praderio *et al.*, 2019). No presente estudo, foram colhidas amostras por lavagem e biópsia uterina a 17 (85%) cadelas nunca inseminadas e/ou copuladas, a 2 (10%) cadelas sem informação disponível e a apenas 1 (5%) cadela primípara. Assim, é possível que a ausência de casos positivos, para além dos fatores já mencionados, possa estar associada ao elevado número de cadelas que nunca foram inseminadas e que, por isso, não sofreram a reação inflamatória, transitória ou persistente, originada pelo contacto dos espermatozoides e outros produtos inflamatórios com o endométrio (England *et al.*, 2012a; Freeman *et al.*, 2013b), o que pode suportar a hipótese de que a endometrite em cadelas possa ser desencadeada pela cópula ou IA. A endometrite persistente induzida pela inseminação é considerada uma das principais causas de infertilidade em éguas (Lüttgenau *et al.*, 2021) e os resultados obtidos na última década (Fontaine *et al.*, 2009; Christensen *et al.*, 2012; England *et al.*, 2012a; England *et al.*, 2012b; Freeman *et al.*, 2013b; Mir *et al.*, 2013; Gifford *et al.*, 2014; García Mitacek *et al.*, 2017; Praderio *et al.*, 2019; Bukowska *et al.*, 2020; Pascottini *et al.*, 2023) parecem indicar que a endometrite representa a principal doença uterina em cadelas, com potencial impacto negativo na fertilidade. Nesta perspetiva, o

interesse de cada criador em reproduzir a sua cadela, contribui simultaneamente para a sua infertilidade, condição que pretendem minimizar.

A principal limitação de alguns estudos que reportaram elevadas prevalências de endometrite é a ausência de informação sobre o histórico reprodutivo da maioria, ou mesmo totalidade, das cadelas incluídas (Christensen *et al.*, 2012; García Mitacek *et al.*, 2017; Praderio *et al.*, 2019; Bukowska *et al.*, 2020), o que não permite esclarecer a fisiopatologia da endometrite nesta espécie. Dado o reduzido número de amostras, o presente estudo também não permitiu aprofundar o conhecimento sobre a fisiopatologia da doença. Para tal, seria pertinente incluir um elevado número de cadelas, divididas em três grupos: cadelas nunca inseminadas; cadelas inseminadas durante o estudo; e cadelas que já pariram, mas que não foram inseminadas durante o estudo. Em caso de elevada prevalência de endometrite, o primeiro, segundo e terceiro grupo poderiam indicar, respetivamente, se a doença pode ser classificada em pós-estro, devido a infeções uterinas durante o proestro e estro, pós-inseminação, devido à acumulação de conteúdo inflamatório introduzido durante a IA ou durante a cópula, ou pós-parto, associada a trauma e colonização bacteriana do endométrio.

A lavagem uterina permite colher uma amostra representativa de toda a superfície do endométrio, ao contrário da zaragatoa e da escova de citologia. Contudo, tal como identificado previamente em equinos (de Amorim *et al.*, 2016; Rua *et al.*, 2018), a presença de debris celulares, má preservação celular e, particularmente, elevada concentração de eritrócitos (Figura 7), dificultou a interpretação de algumas amostras. Já a escova de citologia pode induzir endometrite iatrogénica na colheita de amostras por via transcervical (Watts & Wright, 1995).

A percentagem das cadelas que apresentaram resultados citológicos indicativos de endometrite foi de 35% ($n=7$), valor semelhante ao reportado por Fontaine *et al.*, (2009). Apesar da citologia endometrial ser um meio de diagnóstico comum em bovinos e equinos (Pascottini *et al.*, 2023), os resultados obtidos no presente estudo por citologia endometrial não foram concordantes com os resultados obtidos por histopatologia de biópsia uterina, à semelhança de outros estudos nos quais foi realizada a mesma comparação (Praderio *et al.*, 2019; Bukowska *et al.*, 2020). Uma elevada concentração de neutrófilos foi identificada tanto em cadelas com endométrio normal como com endometrite aguda (Praderio *et al.*, 2019). O critério aplicado por estes autores, isto é, uma concentração de neutrófilos igual ou superior a 2% em relação às células epiteliais, serviu de base para o presente estudo. Este valor limite, extrapolado de estudos em éguas, pode não ser adequado para cadelas. Contudo, cadelas classificadas com endometrite subaguda e crónica por histopatologia, estiveram associadas a menores concentrações de neutrófilos, pelo que um limite superior para o diagnóstico de

endometrite apenas poderia diferenciar cadelas com e sem endometrite aguda, enquanto a inflamação subaguda ou crónica do endométrio permaneceria por diagnosticar.

Apesar da citologia endometrial, por zaragatoa, ter sido considerada previamente como um meio inadequado para o diagnóstico de lesões uterinas em cadelas clinicamente saudáveis (Praderio *et al.*, 2019; Bukowska *et al.*, 2020), o mesmo não pode ser concluído no presente estudo, devido à diferença na técnica usada. Uma vez que o fluido de lavagem uterina é representativo de toda a superfície do endométrio, o endométrio classificado como normal na análise histopatológica é indicativo da região em específico que foi colhida, o que não exclui a presença de focos inflamatórios localizados noutras regiões do útero.

Embora o útero já ter sido considerado um ambiente estéril, atualmente sabe-se que é constituído por um microbioma diversificado (Lyman *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2023). Ao longo desta investigação, foram isoladas bactérias do endométrio em 65% das cadelas, semelhante aos resultados obtidos por Maksimović *et al.* (2012) e Goericke-Pesch *et al.* (2018). Algumas das espécies bacterianas isoladas foram previamente identificadas no útero de cadelas (Maksimović *et al.*, 2012; Goericke-Pesch *et al.*, 2018; Rocha *et al.*, 2022), bem como de éguas (Thomson *et al.*, 2023), consideradas como agentes comensais deste órgão.

No presente estudo, o género *Enterococcus* foi o mais frequentemente isolado (45%). Cadelas com piómetra apresentaram uma maior abundância uterina destas bactérias em comparação com cadelas saudáveis (Zheng *et al.*, 2023). De facto, *Enterococcus faecalis* está associado a endometrite crónica em mulheres, ao induzir um estado inflamatório, pelo aumento da interleucina-6 e interleucina-1 β (citocinas pró-inflamatórias), apoptose das células epiteliais do endométrio e a redução da expressão de biomarcadores necessários à decidualização e implantação do embrião (Zhang *et al.*, 2021). Por outro lado, tem sido identificada uma elevada prevalência de *Staphylococcus* spp. no útero de cadelas saudáveis (Maksimović *et al.*, 2012; Lyman *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2023).

Conforme outros estudos em cadelas saudáveis (Maksimović *et al.*, 2012; Praderio *et al.*, 2019; Mogheiseh *et al.*, 2020), foi obtido apenas um isolado de *Escherichia coli*. Lyman *et al.* (2019) realizaram uma análise metagenómica no endométrio de cadelas sem doenças associadas e não detetaram qualquer isolado de *Escherichia* spp. Contudo, esta é a bactéria mais frequentemente isolada em casos de piómetra (Lee *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2022; Xavier *et al.*, 2023). Tendo em conta estes resultados, parece que *Escherichia coli* não deve ser considerada uma bactéria comensal do endométrio, e a sua colonização uterina, por determinados mecanismos de virulência que a permitem progredir da microbiota fecal para o tecido uterino (Henriques *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2020), poderá promover a disbiose da

microbiota endometrial que, sob a ação imunossupressora da progesterona durante o diestro (Pires & Payan-Carreira, 2015), pode levar ao desenvolvimento de piómetra.

Neste estudo foi também identificada a bactéria *Serratia marcescens*. Esta bactéria é um agente oportunista e ubiqüitário, associado a surtos em hospitais veterinários, particularmente devido à sua capacidade em sobreviver em soluções antissépticas como clorexidina (Keck *et al.*, 2020; Allen *et al.*, 2022). Foi também isolada em cadelas com piómetra e situações de aborto em bovinos (Das, Paranjape & Pitt, 1988; Lee *et al.*, 2000).

A detecção de *Pantoea agglomerans* em 20% ($n=2$) das cadelas foi um resultado inesperado. É uma bactéria associada a vegetação, pelo que a maioria dos casos reportados em medicina humana têm como causa lesões penetrantes por constituintes de plantas contaminados, como espinhos ou lascas de madeira, com consequente artrite séptica (Rave *et al.*, 2012; Koester *et al.*, 2020), tal como na espécie canina (Muir *et al.*, 2007; Prior & Arthurs, 2021). Outro possível meio de transmissão é por via hematogénea, através da picada da carrapa *Ixodes ricinus* (Tomaso *et al.*, 2018). Curiosamente, ambas as cadelas pertenciam à mesma associação e não se encontravam desparasitadas. Além disso, ambas estavam em proestro, pelo que também é possível que tenha ocorrido a contaminação da microbiota vaginal por contacto com plantas contaminadas e posterior translocação ascendente para o endométrio. Ao nível do trato reprodutivo, infeções por *Pantoea agglomerans* foram descritas como causa de aborto em equinos (Singh *et al.*, 2004; Henker *et al.*, 2020; Akter *et al.*, 2021). Do conhecimento do autor, apenas um isolado uterino de *Pantoea* spp., foi reportado num estudo que envolveu 50 cadelas submetidas a cesariana devido a distócia (Goericke-Pesch *et al.*, 2018).

A maioria das cadelas (65%) em estudo apresentou crescimento bacteriano nas amostras colhidas do endométrio, em contraste com outros resultados. Por histopatologia, Mir *et al.*, (2013) reportaram uma prevalência de 33,3% de endometrite, mas não detetaram qualquer isolado bacteriano nas 21 cadelas incluídas. Praderio *et al.*, (2019) também não identificaram bactérias em cadelas com endométrio normal e foram obtidos apenas quatro casos positivos das 27 cadelas com endometrite, nomeadamente *E. coli*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* β -hemolítico. É provável que esta diferença de resultados possa estar associada à técnica de colheita da amostra. No presente estudo, a análise bacteriológica foi realizada no fluido obtido por lavagem uterina e em biópsia uterina. A lavagem uterina, embora a amostra obtida seja representativa de toda a superfície do endométrio, permitiu detetar a presença de bactérias num menor número de cadelas (30%) em relação à biópsia uterina (45%) (Figura 9). A biópsia reflete apenas os resultados da região colhida, mas de camadas mais profundas. Em éguas, a bactéria *Streptococcus equi*

subespécie *zooepidemicus* tem a capacidade de causar infecções profundas, o que pode induzir falsos negativos quando usadas técnicas limitadas à superfície do endométrio (Pisello *et al.*, 2019). No presente estudo verificou-se que quase a totalidade (85,7%; $n=6$) das bactérias Gram-negativas, pertencentes à ordem Enterobacterales, foi isolada apenas por biópsia uterina. Em ambos os estudos comparados anteriormente (Mir *et al.*, 2013; Praderio *et al.*, 2019), os autores colheram amostras do endométrio para análise bacteriológica por zaragatoa. Esta técnica apresenta uma sensibilidade superior, comparativamente à lavagem uterina em éguas (Teixeira-Soares *et al.*, 2022), embora o contrário também tenha sido observado (Christoffersen *et al.*, 2015) e apresenta a condicionante de ser limitada não só à superfície do endométrio, como à região colhida, não sendo, por isso, representativa de todo o órgão (Christoffersen *et al.*, 2015; Pisello *et al.*, 2019). A conjugação da lavagem uterina e da biópsia uterina minimiza as limitações associadas a cada técnica, isto é, a profundidade e representatividade, respetivamente, o que pode justificar a deteção de 20 espécies bacterianas em 65% das cadelas.

Como referido na secção dos resultados, as cadelas incluídas neste estudo encontravam-se em proestro (76%) e em anestro (24%). Em ambos os estudos de Mir *et al.* (2013) e Praderio *et al.* (2019), os autores apenas incluíram cadelas em diestro. Por outro lado, o diestro foi a fase na qual um maior número de bactérias foi identificado no endométrio de cadelas sem patologia associada (Maksimović *et al.*, 2012; Mogheiseh *et al.*, 2020). Contudo, todos estes estudos procederam ao isolamento bacteriano através de métodos baseados em cultura estando, por isso, limitados à deteção de microrganismos que crescem em condições favoráveis para tal (Rota *et al.*, 2020). Através da análise metagenómica, independente dos métodos padrão de cultura, concluiu-se que o microbioma endometrial não varia consoante a fase do ciclo éstrico (Lyman *et al.*, 2019).

É de ressaltar que a maioria dos isolados obtidos no presente estudo foi identificada como pertencente à microbiota vaginal (Loncaric *et al.*, 2020; Rota *et al.*, 2020; Golińska *et al.*, 2021). O microbioma endometrial parece ser distinto do microbioma vaginal, permanecendo inalterado por potenciais translocações ascendentes de bactérias durante o estro e proestro em cadelas saudáveis (Lyman *et al.*, 2019), pelo que é plausível que os resultados observados possam refletir a microbiota vaginal devido a contaminação durante a técnica de colheita das amostras. Embora esta tenha sido realizada sob condições assépticas, evidenciadas pela ausência de bactérias isoladas em 35% ($n=7$) das cadelas através dos métodos bacteriológicos padrão, teria sido relevante proceder à cultura vaginal de cada cadela para comparar com os resultados obtidos do endométrio.

Através do TSA, confirmou-se o perfil de resistência intrínseca dos isolados do complexo *Enterobacter cloacae* (*Enterobacter cloacae* e *Enterobacter hormaechei*) (amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina e cefoxitina) e das bactérias *Klebsiella oxytoca* (ampicilina) e *Serratia marcescens* (amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, cefoxitina e nitrofurantoína) (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2023*). Todos estes agentes bacterianos demonstraram perfil de multirresistência, ou seja, resistência a pelo menos três classes diferentes de antibióticos. A microbiota vaginal compreende um microbioma rico (Lyman *et al.*, 2019), pelo que a administração de antibióticos sem evidência de sinais indicativos de infecção, pode favorecer não só o desenvolvimento de resistências a estes medicamentos, bem como infecções do trato geniturinário como consequência do desequilíbrio da microbiota comensal (Groppetti *et al.*, 2012; Golińska *et al.*, 2021; Pascottini *et al.*, 2023).

Uma vez que não foram identificadas cadelas com endometrite por histopatologia, não foi possível determinar potenciais fatores etiológicos. Em éguas, os procedimentos aplicados para reduzir a contaminação bacteriana, como higienizar a vulva e o pénis antes da IA; garantir boas condições sanitárias na sala de parto; usar diluidores de sémen com antibióticos; poderão ser úteis para garantir o equilíbrio da microbiota comensal e, assim, prevenir a endometrite em cadelas (Pascottini *et al.*, 2023). Outro passo inclui a monitorização ultrassonográfica do útero antes e após a IA, uma vez que a acumulação de fluido intrauterino, no momento da ovulação e mais de 24 horas após a inseminação, afeta negativamente a fertilidade na cadela (England *et al.*, 2012a; Freeman, Green & England, 2013a). Em éguas, a lavagem uterina antes da inseminação promove a contractilidade uterina e a remoção do conteúdo intrauterino inflamatório, preparando o endométrio para a implantação do embrião (Lyman *et al.*, 2018).

Do conhecimento do autor, este é o primeiro estudo que compara a citologia do fluido de lavagem uterina e a histopatologia de biópsia uterina, colhidas por via transcervical, para o diagnóstico de endometrite em cadelas. Apesar da falta de concordância entre os resultados obtidos por estes dois meios de diagnóstico, a avaliação da eficácia da técnica aplicada é importante na medida em que se trata de um método menos invasivo quando comparado com os riscos associados à laparotomia. Adicionalmente, a identificação de bactérias MDR em cadelas sem história de antibioterapia, reforça que o uso indiscriminado de antibióticos é uma prática a evitar, embora seja comum no tratamento de infertilidade ou como forma de prevenção de infecções uterinas antes e após a IA ou cópula (England *et al.*, 2012b; Groppetti *et al.*, 2012; England *et al.*, 2021).

6. Conclusões

Os resultados obtidos por histopatologia sugerem que a endometrite não está presente em cadelas clinicamente saudáveis. Os resultados podem ser influenciados pelo tamanho e idade da população em estudo e pela fase do ciclo éstrico em que as amostras foram colhidas. Apesar da fisiopatologia permanecer incerta, tendo em conta que 85% ($n=17$) das cadelas nunca foram previamente inseminadas, é possível considerar que estes resultados sejam indicativos de que a endometrite em cadelas possa ser induzida pelos mesmos fatores descritos em éguas, nomeadamente a inflamação persistente após a cópula ou a inseminação artificial.

Ainda assim, não é possível excluir a presença de endometrite na população em estudo, dadas as limitações inerentes à técnica descrita para a colheita das amostras, como a ausência de visualização do útero durante o procedimento, a falta de representatividade do endométrio e a colheita de amostras associadas a artefactos de esmagamento. Por conseguinte, a colheita de biópsias uterinas por via transcervical, parece não ser a mais indicada para o diagnóstico de endometrite, embora a realização de um maior número de biópsias possa melhorar a sensibilidade.

Tendo em conta os resultados histopatológicos, não foi possível determinar a utilidade da citologia do fluido de lavagem uterina como meio para o diagnóstico de endometrite em cadelas. Futuros estudos são necessários para compreender o impacto da endometrite na fertilidade canina e determinar a eficácia desta última técnica, para uma possível abordagem menos invasiva.

Uma vez que neste estudo foram identificadas bactérias possivelmente pertencentes à microbiota endometrial, as mesmas poderão ser isoladas em cadelas com endometrite. Nestes casos, os resultados bacteriológicos não devem ser considerados como o fator etiológico, nem a razão para iniciar antibioterapia quando não estão presentes sinais indicativos de infeção. De facto, o uso indiscriminado de antibióticos promove o desenvolvimento de bactérias resistentes, o que poderá ter implicações na antibioterapia durante o tratamento de infertilidade ou como forma de prevenção de infeções uterinas antes e após a cópula ou a inseminação artificial.

7. Referências Bibliográficas

Abdelnaby, E. A., Emam, I. A., Salem, N. Y., Ramadan, E. S., Khattab, M. S., Farghali, H. A., & Abd El Kader, N. A. (2020). Uterine hemodynamic patterns, oxidative stress, and chromoendoscopy in mares with endometritis. *Theriogenology*, 158, 112-120.

Abe, Y., Yokozawa, S., Umemiya-Shirafuji, R., Moumouni, P. F. A., Suwa, Y., & Suzuki, H. (2017). Fertilizing ability of canine spermatozoa cryopreserved with skim milk-based extender in a retrospective study. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1), 237-242.

Aires, L. P. N., Gasser, B., Silva, P., Del'Aguila-Silva, P., Yamada, D. I., Carneiro, R. K., ... Feliciano, M. A. R. (2022). Ovarian contrast-enhanced ultrasonography and Doppler fluxometry in bitches during the postovulatory estrus and corpora lutea formation. *Theriogenology*, 194, 162-170.

Akter, R., El-Hage, C. M., Sansom, F. M., Carrick, J., Devlin, J. M., & Legione, A. R. (2021). Metagenomic investigation of potential abortigenic pathogens in foetal tissues from Australian horses. *BMC genomics*, 22(1), 1-14.

Alghamdi, A. S., Foster, D. N., Carlson, C. S., & Troedsson, M. H. (2005). Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 53(5), 230-237.

Allen, J. L., Doidge, N. P., Bushell, R. N., Browning, G. F., & Marends, M. S. (2022). Healthcare-associated infections caused by chlorhexidine-tolerant *Serratia marcescens* carrying a promiscuous IncHI2 multi-drug resistance plasmid in a veterinary hospital. *Plos one*, 17(3), e0264848.

Aralla, M., Groppetti, D., Caldarini, L., Cremonesi, F., & Arrighi, S. (2013). Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term. *Research in veterinary science*, 95(1), 15-22.

Arlas, T. R., Wolf, C. A., Petrucci, B. P. L., Estanislau, J. F., Gregory, R. M., Jobim, M. I. M., & Mattos, R. C. (2015). Proteomics of endometrial fluid after dexamethasone treatment in mares susceptible to endometritis. *Theriogenology*, 84(4), 617-623.

Arlt, S. (2018). Canine ovulation timing: A survey on methodology and an assessment on reliability of vaginal cytology. *Reproduction in domestic animals*, 53(3), 53-62.

Barr, F. J. (1988). Pregnancy diagnosis and assessment of fetal viability in the dog: a review. *Journal of Small Animal Practice*, 29(10), 647-656.

Barstow, C., Wilborn, R. R., & Johnson, A. K. (2018). Breeding soundness examination of the bitch. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 48(4), 547-566.

Beccaglia, M., Alonge, S., Trovo', C., & Luvoni, G. C. (2016). Determination of gestational time and prediction of parturition in dogs and cats: an update. *Reproduction in Domestic Animals*, 51 (1), 12-17.

Bergeron, L. H., Nykamp, S. G., Brisson, B. A., Madan, P., & Gartley, C. J. (2013). An evaluation of B-mode and color Doppler ultrasonography for detecting periovulatory events in the bitch. *Theriogenology*, 79(2), 274-283.

Bergeron, L. H., Nykamp, S. G., Brisson, B. A., Madan, P., Sears, W., & Gartley, C. J. (2014). Vaginal impedometry for detection of optimal breeding time in bitches. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245(12), 1360-1366.

Billhaq, D. H., Lee, S. H., & Lee, S. (2020). The potential function of endometrial-secreted factors for endometrium remodeling during the estrous cycle. *Animal Science Journal*, 91(1), e13333.

Bishop, C. V., Xu, F., Molskness, T. A., Stouffer, R. L., & Hennebold, J. D. (2015). Dynamics of immune cell types within the macaque corpus luteum during the menstrual cycle: role of progesterone. *Biology of reproduction*, 93(5), 112-1.

Bouchard, G. F., Solorzano, N., Concannon, P. W., Youngquist, R. S., & Bierschwal, C. J. (1991). Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone. *Theriogenology*, 35(3), 603-611.

Bukowska, B., Jurczak, A., Tobolski, D., & Janowski, T. (2020). Prevalence of subclinical uterine pathologies diagnosed by biopsy and cytological and bacteriological findings in cyclic bitches. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 23(4), 595–603.

Burgess, C. M., Clutterbuck, A. L., & England, G. C. W. (2012b). The effect of cryopreservation on the capacitation status and epithelial cell attachment capability of dog spermatozoa. *The Veterinary Journal*, 192(3), 398-402.

Burgess, D. M., Mitchell, K. E., & Thomas, P. G. A. (2012a). Coeliotomy-assisted intrauterine insemination in dogs: a study of 238 inseminations. *Australian Veterinary Journal*, 90(8), 283-290.

Cecere, J., Purswell, B., & Panciera, D. (2020). Levothyroxine supplementation in hypothyroid bitches during pregnancy. *Theriogenology*, 142, 48-53.

Chhikara, N., Tomar, A. K., Datta, S. K., & Yadav, S. (2022). Proteomic changes in human spermatozoa during in vitro capacitation and acrosome reaction in normozoospermia and asthenozoospermia. *Andrology*, 11(1), 73-85.

Christensen, B. W., Schlafer, D. H., Agnew, D. W., Wang, C., Kozlowski, C., & Asa, C. S. (2012). Diagnostic value of transcervical endometrial biopsies in domestic dogs compared with full-thickness uterine sections. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (6), 342-346.

Christoffersen, M., Brandis, L., Samuelsson, J., Bojesen, A. M., Troedsson, M. H. T., & Petersen, M. R. (2015). Diagnostic double-guarded low-volume uterine lavage in mares. *Theriogenology*, 83(2), 222-227.

Christoffersen, M., Woodward, E. M., Bojesen, A. M., Petersen, M. R., Squires, E. L., Lehn-Jensen, H., & Troedsson, M. H. T. (2012). Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. *Theriogenology*, 78(5), 991-1004.

Cochran, M. R., Runcan, E. E., Premanandan, C., McRae, G., & da Silva, M. A. C. (2023). Factors Affecting Pregnancy Success in the Bitch Following Transcervical Insemination. *Topics in Companion Animal Medicine*, 55, 100800.

Concannon, P. W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal reproduction science*, 124(3-4), 200-210.

Da Silva-Álvarez, E., Gómez-Arrones, V., Martín-Cano, F. E., Gaitskell-Phillips, G., Ortiz-Rodríguez, J. M., Carrasco, J. J., ... Ortega Ferrusola, C. (2022). Endometrial area of the blood flow as a marker of endometritis in equine. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(5), 98-102.

Das, A. M., Paranjape, V. L., & Pitt, T. L. (1988). *Serratia marcescens* infection associated with early abortion in cows and buffaloes. *Epidemiology & Infection*, 101(1), 143-149.

Davidson, A. P., & Baker, T. W. (2009). Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Topics in companion animal medicine*, 24(2), 55-63.

de Amorim, M. D., Gartley, C. J., Foster, R. A., Hill, A., Scholtz, E. L., Hayes, A., & Chenier, T. S. (2016). Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low-volume lavage, and uterine biopsy and combinations in the diagnosis of equine endometritis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 44, 54-61.

de Freitas, L. A., Mota, G. L., Silva, H. V. R., Carvalho, C. F., & da Silva, L. D. M. (2016). Can maternal-fetal hemodynamics influence prenatal development in dogs?. *Animal reproduction science*, 172, 83-93.

De Gier, J., Beijerink, N. J., Kooistra, H. S., & Okkens, A. C. (2008). Physiology of the canine anoestrus and methods for manipulation of its length. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(2), 157-164.

de la Fuente-Lara, A., Hesser, A., Christensen, B., Gonzales, K., & Meyers, S. (2019). Effects from aging on semen quality of fresh and cryopreserved semen in Labrador Retrievers. *Theriogenology*, 132, 164-171.

De los Reyes, M., Palomino, J., Parraguez, V. H., & Ramirez, F. (2017). Analysis of LH receptor in canine ovarian follicles throughout the estrous cycle. *Theriogenology*, 93, 71-77.

Díaz-Bertrana, M. L., Deleuze, S., Pitti Rios, L., Yeste, M., Morales Fariña, I., & Rivera del Alamo, M. M. (2021). Microbial prevalence and antimicrobial sensitivity in equine endometritis in field conditions. *Animals*, 11(5), 1476.

Dockweiler, J. C., Cossic, B., Donnelly, C. G., Gilbert, R. O., Buckles, E., & Cheong, S. H. (2016). Infertility associated with the absence of endometrial progesterone receptors in a bitch. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(1), 174-178.

Doumith, M., Day, M. J., Hope, R., Wain, J., & Woodford, N. (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 3108–3110.

Eilts, B. E., Davidson, A. P., Hosgood, G., Paccamonti, D. L., & Baker, D. G. (2005). Factors affecting gestation duration in the bitch. *Theriogenology*, 64(2), 242-251.

England, G. C. W., & Russo, M. (2006). Ultrasonographic characteristics of early pregnancy failure in bitches. *Theriogenology*, 66(6-7), 1694-1698.

England, G. C. W., Burgess, C. M., & Freeman, S. L. (2012b). Perturbed sperm-epithelial interaction in bitches with mating-induced endometritis. *The Veterinary Journal*, 194(3), 314-318.

England, G. C. W., Moxon, R., & Freeman, S. L. (2012a). Delayed uterine fluid clearance and reduced uterine perfusion in bitches with endometrial hyperplasia and clinical management with postmating antibiotic. *Theriogenology*, 78(7), 1611-1617.

England, G. C. W., Rijsselaere, T., Campbell, A., Moxon, R., & Freeman, S. L. (2021). Normal and abnormal response to sperm deposition in female dogs: A review and new hypotheses for endometritis. *Theriogenology*, 159, 176-183.

England, G. C. W., Russo, M., & Freeman, S. L. (2013). The bitch uterine response to semen deposition and its modification by male accessory gland secretions. *The Veterinary Journal*, 195(2), 179-184.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2023). Expected Resistance Phenotypes. Acedido em 18 Setembro 2023 em https://www.eucast.org/expert_rules_and_expected_phenotypes/expected_phenotypes.

Evcı, E. C., Aslan, S., Schäfer-Somi, S., Ergene, O., Sayiner, S., Darbaz, I., ... Wehrend, A. (2023). Monitoring of canine pregnancy by considering Anti-Müllerian hormone, C-reactive protein, progesterone and complete blood count in pregnant and non-pregnant dogs. *Theriogenology*, 195, 69-76.

Fontaine, E., Levy, X., Grellet, A., Luc, A., Bernex, F., Boulouis, H. J., & Fontbonne, A. (2009). Diagnosis of endometritis in the bitch: a new approach. *Reproduction in domestic animals*, 44 (2), 196-199.

Fontbonne, A. (2023). Causes of pregnancy arrest in the canine species. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(2), 72-83.

Freccero, F., Mislei, B., Bucci, D., Dondi, F., & Mari, G. (2022). Effects of Intra-Uterine Fluid Accumulation after Artificial Insemination on Luteal Function in Mares. *Animals*, 13(1), 67.

Freeman, S. L., Green, M. J., & England, G. C. W. (2013a). Prevalence and effect of uterine luminal free fluid on pregnancy and litter size in bitches. *Theriogenology*, 80(2), 73-76.

Freeman, S. L., Green, M. J., & England, G. C. W. (2013b). Uterine fluid from bitches with mating-induced endometritis reduces the attachment of spermatozoa to the uterine epithelium. *The Veterinary Journal*, 198(1), 76-80.

Friso, A. M., Segabinazzi, L. G., Cyrino, M., Correal, S. B., Freitas-Dell'Aqua, C. P., do Carmo, M. T., ... Alvarenga, M. A. (2019). Periovarian administration of firocoxib did not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response in mares. *Theriogenology*, 138, 24-30.

Gao, Y., Li, Y., Wang, J., Zhang, X., Yao, D., Ding, X., ... Zhang, Y. (2023). Melatonin Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Endometritis by Inhibiting the Activation of NLRP3 Inflammasome through Autophagy. *Animals*, 13(15), 2449.

García Mitacek, M. C., Praderio, R. G., Stornelli, M. C., de la Sota, R. L., & Stornelli, M. A. (2017). Prostaglandin synthesis enzymes' gene transcription in bitches with endometritis. *Reproduction in domestic animals*, 52 (2), 298-302.

Gaytán, L., Rascón, C. R., Angel-García, O., Véliz, F. G., Contreras, V., & Mellado, M. (2020). Factors influencing English Bulldog bitch fertility after surgical uterine deposition of fresh semen. *Theriogenology*, 142, 315-319.

Gee, N. R., Rodriguez, K. E., Fine, A. H., & Trammell, J. P. (2021). Dogs supporting human health and well-being: A biopsychosocial approach. *Frontiers in veterinary science*, 8, 630465.

Ghallab, R. S., El-beskawy, M., El-Shereif, A. A., Rashad, A. M., & Elbehiry, M. A. (2023). Impact of intrauterine infusion of Platelets-Rich plasma on endometritis and reproductive performance of Arabian mare. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(5), 622-629.

Gifford, A. T., Scarlett, J. M., & Schlafer, D. H. (2014). Histopathologic findings in uterine biopsy samples from subfertile bitches: 399 cases (1990–2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(2), 180-186.

Glencorse, D., Grupen, C. G., & Bathgate, R. (2023). Vaginal and vestibular electrical resistance as an alternative marker for optimum timing of artificial insemination with liquid-stored and frozen-thawed spermatozoa in sows. *Scientific Reports*, 13(1), 12103.

Gloria, A., Contri, A., Carluccio, A., & Robbe, D. (2018). Blood periovulatory progesterone quantification using different techniques in the dog. *Animal reproduction science*, 192, 179-184.

Gobello, C. (2014). Prepubertal and pubertal canine reproductive studies: conflicting aspects. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(6), e70-e73.

Gobello, C. (2021). Revisiting canine pseudocyesis. *Theriogenology*, 167, 94-98.

Goericke-Pesch, S., Fux, V., Prenger-Berninghoff, E., & Wehrend, A. (2018). Bacteriological findings in the canine uterus during Caesarean section performed due to dystocia and their correlation to puppy mortality at the time of parturition. *Reproduction in domestic animals*, 53(4), 889-894.

Golińska, E., Sowińska, N., Tomusiak-Plebanek, A., Szydło, M., Witka, N., Lenarczyk, J., & Strus, M. (2021). The vaginal microflora changes in various stages of the estrous cycle of healthy female dogs and the ones with genital tract infections. *BMC veterinary research*, 17, 1-8.

Gołyszny, M., Obuchowicz, E., & Zieliński, M. (2022). Neuropeptides as regulators of the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis activity and their putative roles in stress-induced fertility disorders. *Neuropeptides*, 91, 102216.

Graubner, F. R., Gram, A., Kautz, E., Bauersachs, S., Aslan, S., Agaoglu, A. R., ... Kowalewski, M. P. (2017). Uterine responses to early pre-attachment embryos in the domestic dog and comparisons with other domestic animal species. *Biology of reproduction*, 97(2), 197-216.

Graubner, F. R., Reichler, I. M., Rahman, N. A., Payan-Carreira, R., Boos, A., & Kowalewski, M. P. (2016). Decidualization of the canine uterus: from early until late gestational in vivo morphological observations, and functional characterization of immortalized canine uterine stromal cell lines. *Reproduction in domestic animals*, 52 (2), 137-147.

Groppetti, D., Aralla, M., Bronzo, V., Bosi, G., Pecile, A., & Arrighi, S. (2015). Periovarian time in the bitch: What's new to know?: Comparison between ovarian histology and clinical features. *Animal reproduction science*, 152, 108-116.

Groppetti, D., Pecile, A., Barbero, C., & Martino, P. A. (2012). Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility. *Theriogenology*, 77(8), 1549-1556.

Gurler, H., Koldas, E., Onyay, F., & Akcay, A. (2018). Efficiency of vaginal electrical impedance to determine the stage of the reproductive cycle in bitches. *Med. Veter*, 74(3).

Hahn, S. E., Jo, Y. K., Jin, Y. K., & Jang, G. (2017). Timing of fertile period for successful pregnancy in American Bully dogs. *Theriogenology*, 104, 49-54.

Hase, M., Hori, T., Kawakami, E., & Tsutsui, T. (2000). Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62(3), 243-248.

Henker, L. C., Lorenzetti, M. P., Keller, A., Siqueira, F. M., Driemeier, D., & Pavarini, S. P. (2020). Fibrinonecrotic placentitis and abortion associated with *Pantoea agglomerans* infection in a mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, 92, 103156.

Henriques, S., Silva, E., Silva, M. F., Carvalho, S., Diniz, P., Lopes-da-Costa, L., & Mateus, L. (2016). Immunomodulation in the canine endometrium by uteropathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary research*, 47(1), 1-17.

Hensel, M. E., Negron, M., & Arenas-Gamboa, A. M. (2018). Brucellosis in dogs and public health risk. *Emerging infectious diseases*, 24(8), 1401.

Herbison, A. E. (2020). A simple model of estrous cycle negative and positive feedback regulation of GnRH secretion. *Frontiers in neuroendocrinology*, 57, 100837.

Hinderer, J., Lüdeke, J., Riege, L., Haimerl, P., Bartel, A., Kohn, B., ... Art, S. P. (2021). Progesterone concentrations during canine pregnancy. *Animals*, 11(12), 3369.

Hollinshead, F. K., & Hanlon, D. W. (2017). Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. *Theriogenology*, 101, 62-72.

Hollinshead, F. K., & Hanlon, D. W. (2019). Normal progesterone profiles during estrus in the bitch: A prospective analysis of 1420 estrous cycles. *Theriogenology*, 125, 37-42.

Johnson, C. A. (2008). Pregnancy management in the bitch. *Theriogenology*, 70(9), 1412-1417.

Johnston, S. D, Kustritz, M. V. R. & Olson, P. N. S. (2001). Canine Pregnancy. In: S. D. Johnston, M. V. R. Kustritz & P. N. S. Olson. (Eds.) *Canine and Feline Theriogenology* (1ªEd., pp. 16-31). Estados Unidos da América: Saunders.

Jurczak, A., & Janowski, T. (2018). Arterial ovarian blood flow in the periovulatory period of GnRH-induced and spontaneous estrous cycles of bitches. *Theriogenology*, 119, 131-136.

Kawasaki, Y., Sakurai, D., Yoshihara, T., Tsuchida, M., Harakawa, S., & Suzuki, H. (2020). Effect of quercetin on the motility of cryopreserved canine spermatozoa. *Cryobiology*, 96, 50-54.

Kealy, J. K., McAllister, H. & Graham, J. P. (2011). The Abdomen. In: J. K. Kealy, H. McAllister & J. P. Graham (Eds.) *Diagnostic Radiology and Ultrasonography of the Dog and Cat* (5ªEd., pp: 23-198). St. Louis: Elsevier Saunders.

Keck, N., Dunie-Merigot, A., Dazas, M., Hirchaud, E., Laurence, S., Gervais, B., ... & Haenni, M. (2020). Long-lasting nosocomial persistence of chlorhexidine-resistant *Serratia marcescens* in a veterinary hospital. *Veterinary Microbiology*, 245, 108686.

Kelleher, A. M., DeMayo, F. J., & Spencer, T. E. (2019). Uterine glands: developmental biology and functional roles in pregnancy. *Endocrine reviews*, 40(5), 1424-1445.

Khan, F. A., Chenier, T. S., Murrant, C. L., Foster, R. A., Hewson, J., & Scholtz, E. L. (2017). Dose-dependent inhibition of uterine contractility by nitric oxide: A potential mechanism underlying persistent breeding-induced endometritis in the mare. *Theriogenology*, 90, 59-64.

Kim, Y., Travis, A. J., & Meyers-Wallen, V. N. (2007). Parturition prediction and timing of canine pregnancy. *Theriogenology*, 68(8), 1177-1182.

Kinns, J. & Nelson, N. (2018). Uterus, Ovaries, and Testes. *In: D.E. Thrall (Ed.), Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology (7thEd., pp. 880-893)*. St. Louis: Elsevier.

Koester, T., Kusano, T., Eijer, H., Escher, R., & Waldegg, G. (2020). Septic arthritis of the knee due to *Pantoea agglomerans*: look for the thorn. *Journal of Bone and Joint Infection*, 6(3), 51-55.

Köhne, M., Kuhlmann, M., Tönißen, A., Martinsson, G., & Sieme, H. (2020). Diagnostic and treatment practices of equine endometritis—a questionnaire. *Frontiers in veterinary science*, 7, 547.

Kowalewski, M. P., Ihle, S., Siemieniuch, M. J., Gram, A., Boos, A., Zduńczyk, S., ... Janowski, T. (2015). Formation of the early canine CL and the role of prostaglandin E2 (PGE2) in regulation of its function: an in vivo approach. *Theriogenology*, 83(6), 1038-1047.

Kowalewski, M. P., Kazemian, A., Klisch, K., Gysin, T., Pereira, M. T. & Gram, A. (2021). Canine Endotheliochorial Placenta: Morpho-Functional Aspects. *In: R. D. Geisert & T. E. Spencer (Eds.) Placentation in Mammals (1stEd., pp. 155-180)*. Suiça: Springer.

Kowalewski, M. P., Mutembei, H. M. I., & Hoffmann, B. (2008). Canine prostaglandin F2 α receptor (FP) and prostaglandin F2 α synthase (PGFS): Molecular cloning and expression in the corpus luteum. *Animal reproduction science*, 107(1-2), 161-175.

Kowalewski, M. P., Pereira, M. T., & Kazemian, A. (2020). Canine conceptus-maternal communication during maintenance and termination of pregnancy, including the role of species-specific decidualization. *Theriogenology*, 150, 329-338.

Kuroda, K., Horikawa, T., Moriyama, A., Nakao, K., Juen, H., Takamizawa, S., ... & Sugiyama, R. (2020). Impact of chronic endometritis on endometrial receptivity analysis results and pregnancy outcomes. *Immunity, inflammation and disease*, 8(4), 650-658.

Kustritz, M. R. (2007). The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*, 68(3), 329-337.

Kustritz, M. V. R. (2005). Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. *Theriogenology*, 64(3), 755-765.

Kustritz, M. V. R. (2020). Vaginal Cytology in the Bitch and Queen. *In*: L. C. Sharkey, M. J. Radin & D. Seelig (Eds.) *Veterinary Cytology* (1stEd., pp. 552-558). Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.

Kutzler, M. A. (2018). Estrous cycle manipulation in dogs. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 48(4), 581-594.

Lascialfari, P., Tesi, M., Manetti, C., Fanelli, D., & Rota, A. (2023). Embryonic resorption rates at canine pregnancy diagnoses: A retrospective evaluation. *Theriogenology*, 206, 71-77.

Lechner, D., Aurich, J., Schäfer-Somi, S., Herbel, J., & Aurich, C. (2021). Combined cryopreservation of canine ejaculates collected at a one-hour interval increases semen doses for artificial insemination without negative effects on post-thaw sperm characteristics. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(9), 1220-1226.

Lee, S. H., & Saadeldin, I. M. (2020). Exosomes as a potential tool for supporting canine oocyte development. *Animals*, 10(11), 1971.

Lee, S. H., Cho, J. K., Shin, N. R., Kim, H. S., Yong, H. Y., Yoo, H. S., ... & Hwang, W. S. (2000). Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria from the uterus of bitches with pyometra. *Korean journal of veterinary research*, 40(4), 763-767.

Lee, S. H., Oh, H. J., Kim, M. J., Kim, G. A., Choi, Y. B., Jo, Y. K., & Lee, B. C. (2018). Effect of co-culture canine cumulus and oviduct cells with porcine oocytes during maturation and subsequent embryo development of parthenotes in vitro. *Theriogenology*, 106, 108-116.

Lévy, X. (2016). Videovaginoscopy of the canine vagina. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(1), 31-36.

Lezama-García, K., Mariti, C., Mota-Rojas, D., Martínez-Burnes, J., Barrios-García, H., & Gazzano, A. (2019). Maternal behaviour in domestic dogs. *International journal of veterinary science and medicine*, 7(1), 20-30.

Li, T., Liao, R., Chan, C., & Greenblatt, E. M. (2023). Deep learning analysis of endometrial histology as a promising tool to predict the chance of pregnancy after frozen embryo transfers. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 40, 901-910.

Linde, C., & Karlsson, I. (1984). The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *Journal of Small Animal Practice*, 25(2), 77-82.

Linde-Forsberg, C., Holst, B. S., & Govette, G. (1999). Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*, 52(1), 11-23.

Loncaric, I., Misic, D., Szostak, M. P., Künzel, F., Schäfer-Somi, S., & Spergser, J. (2020). Broad-spectrum cephalosporin-resistant and/or fluoroquinolone-resistant enterobacterales associated with canine and feline urogenital infections. *Antibiotics*, 9(7), 387.

Lopate, C. (2016). Vaginoscopy and Vaginal Cytology in Dogs. In: S. Ettinger, E. D. Feldman & E. Côté (Eds.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and the Cat* (8^aEd., pp. 1263-1269). St. Louis: Elsevier.

Lopes, C. E., De Carli, S., Weber, M. N., Fonseca, A. C. V., Tagliari, N. J., Foresti, L., ... & Siqueira, F. M. (2020). Insights on the genetic features of endometrial pathogenic *Escherichia coli* strains from pyometra in companion animals: Improving the knowledge about pathogenesis. *Infection, Genetics and Evolution*, 85, 104453.

Lucio, C. D. F., Regazzi, F. M., Silva, L. C. G., Angrimani, D. D. S. R., Nichi, M., & Vannucchi, C. I. (2016). Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. *Theriogenology*, 85(9), 1568-1575.

Lüttgenau, J., Imboden, I., Wellnitz, O., Romer, R., Scaravaggi, I., Neves, A. P., ... Bollwein, H. (2021). Intrauterine infusion of killed semen adversely affects uterine blood flow and endometrial gene expression of inflammatory cytokines in mares susceptible to persistent breeding-induced endometritis. *Theriogenology*, 163, 18-30.

Lyman, C. C., Holyoak, G. R., Meinkoth, K., Wieneke, X., Chillemi, K. A., & DeSilva, U. (2019). Canine endometrial and vaginal microbiomes reveal distinct and complex ecosystems. *PLoS One*, 14(1), e0210157.

Lyman, C. C., Hornberger, K. T., Hallman, R. M., & Holyoak, G. R. (2018). Theriogenology question of the month. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 253(10), 1267-1270.

Mahiddine, F. Y., & Kim, M. J. (2021). Overview on the antioxidants, egg yolk alternatives, and mesenchymal stem cells and derivatives used in canine sperm cryopreservation. *Animals*, 11(7), 1930.

Maksimović, A., Maksimović, Z., Filipovic, S., Besirovic, H., & Rifatbegovic, M. (2012). Vaginal and uterine bacteria of healthy bitches during different stages of their reproductive cycle. *Veterinary Record*, 171(15), 375.

Malaluang, P., Wilén, E., Frosth, S., Lindahl, J. F., Hansson, I., & Morrell, J. M. (2023). Antimicrobial resistance in vaginal bacteria in inseminated mares. *Pathogens*, 12(3), 375.

Martínez-Boví, R., Plaza-Dávila, M., & Cuervo-Arango, J. (2023). The effect of dexamethasone and flunixin-meglumine on ovulation, endometrial oedema, and inter-ovulatory interval length in the mare. *Theriogenology*, 197, 57-61.

Mason, S. J. (2016). A retrospective clinical study of endoscopic-assisted transcervical insemination in the bitch with frozen–thawed dog semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(2), 275-280.

Mason, S. J. (2018). Current review of artificial insemination in dogs. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 48(4), 567-580.

Mason, S. J., & Rous, N. R. (2014). Comparison of endoscopic-assisted transcervical and laparotomy insemination with frozen-thawed dog semen: a retrospective clinical study. *Theriogenology*, 82(6), 844-850.

Meyers-Wallen, V. N. (2007). Unusual and abnormal canine estrous cycles. *Theriogenology*, 68(9), 1205-1210.

Mir, F., Billault, C., Fontaine, E., Sendra, J., & Fontbonne, A. (2011). Estimated pregnancy length from ovulation to parturition in the bitch and its influencing factors: a retrospective study in 162 pregnancies. *Reproduction in domestic animals*, 46(6), 994-998.

Mir, F., Fontaine, E., Albaric, O., Greer, M., Vannier, F., Schlafer, D. H., & Fontbonne, A. (2013). Findings in uterine biopsies obtained by laparotomy from bitches with unexplained infertility or pregnancy loss: an observational study. *Theriogenology*, 79(2), 312-322.

Miranda, S., Carolino, N., Vilhena, H., Payan-Carreira, R., & Pereira, R. M. L. N. (2018). Early embryo development, number, quality, and location and the relationship with plasma progesterone in dogs. *Animal reproduction science*, 198, 238-245.

Mogheiseh, A., Derakhshandeh, A., Heidarifar, S., & Bandariyan, E. (2020). Direct endoscopic lavage and biopsy sampling and evaluation of uterine microflora in various stages of the canine estrous cycle. In *Veterinary Research Forum*, 11 (1), 89 – 92.

Morrell, J. M., & Rocha, A. (2022). A novel approach to minimising acute equine endometritis that may help to prevent the development of the chronic state. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 799619.

Moxon, R., Whiteside, H., & England, G. C. (2016). Prevalence of ultrasound-determined cystic endometrial hyperplasia and the relationship with age in dogs. *Theriogenology*, 86(4), 976-980.

Muir, P., Oldenhoff, W. E., Hudson, A. P., Manley, P. A., Schaefer, S. L., Markel, M. D., & Hao, Z. (2007). Detection of DNA from a range of bacterial species in the knee joints of dogs with inflammatory knee arthritis and associated degenerative anterior cruciate ligament rupture. *Microbial pathogenesis*, 42(2-3), 47-55.

Nagashima, J. B., & Songsasen, N. (2021). Canid reproductive biology: norm and unique aspects in strategies and mechanisms. *Animals*, 11(3), 653.

Nash, D. M., Sheldon, I. M., Herath, S., & Lane, E. A. (2010). Markers of the uterine innate immune response of the mare. *Animal reproduction science*, 119(1-2), 31-39.

National Food Institute (2014). Protocol for PCR amplification of *E. faecium* and *E. faecalis* recommended by the EURL-AR. Acedido em 10 Abril 2023 em <https://www.eurl-ar.eu>.

Niżański, W. (2006). Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology*, 66(2), 470-483.

No, J., Zhao, M., Lee, S., Ock, S. A., Nam, Y., & Hur, T. Y. (2018). Enhanced in vitro maturation of canine oocytes by oviduct epithelial cell co-culture. *Theriogenology*, 105, 66-74.

Nocera, F. P., Maurizi, L., Masullo, A., Nicoletti, M., Conte, A. L., Brunetti, F., ... Longhi, C. (2023). Genotypic and Phenotypic Characterization of *Escherichia coli* Isolates Recovered from the Uterus of Mares with Fertility Problems. *Animals*, 13(10), 1639.

Nowak, M., Gram, A., Boos, A., Aslan, S., Ay, S. S., Önyay, F., & Kowalewski, M. P. (2017). Functional implications of the utero-placental relaxin (RLN) system in the dog throughout pregnancy and at term. *Reproduction*, 154(4), 415-431.

Nowak, M., Rehrauer, H., Ay, S. S., Findik, M., Boos, A., Kautz, E., & Kowalewski, M. P. (2019). Gene expression profiling of the canine placenta during normal and antigestagen-induced luteolysis. *General and Comparative Endocrinology*, 282, 113194.

Olğaç, K. T., Akçay, E., Çil, B., Uçar, B. M., & Daşkın, A. (2017). The use of infrared thermography to detect the stages of estrus cycle and ovulation time in anatolian shepherd dogs. *Journal of Animal Science and Technology*, 59(1), 1-6.

Omar, H., Hambidge, M., Firmanes, B., Shabandri, A. M., & Wilsher, S. (2022). Bacteria isolated from equine uteri in the United Arab Emirates: A retrospective study. *Journal of Equine Veterinary Science*, 115, 104029.

Ortega-Pacheco, A., Rodriguez-Buenfil, J. C., Segura-Correa, J. C., Montesde Oca-González, A. R., & Jiménez-Coello, M. (2006). Prevalence of fetal resorption in stray dogs in Yucatan, Mexico. *Journal of small animal practice*, 47(5), 266-269.

Osawa, T. (2021). Predisposing factors, diagnostic and therapeutic aspects of persistent endometritis in postpartum cows. *Journal of Reproduction and Development*, 67(5), 291-299.

Papa, P. C., & Kowalewski, M. P. (2020). Factors affecting the fate of the canine corpus luteum: Potential contributors to pregnancy and non-pregnancy. *Theriogenology*, 150, 339-346.

Park, C. J., Minabe, S., Hess, R. A., Lin, P. C. P., Zhou, S., Bashir, S. T., ... Ko, C. J. (2023). Single neonatal estrogen implant sterilizes female animals by decreasing hypothalamic KISS1 expression. *Scientific Reports*, 13(1), 9627.

Pasch, L., Schmidt, A., & King, W. (2021). Clinical observations after prebreeding intrauterine plasma infusion in 18 mares inseminated with thawed frozen semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 99, 103389.

Pascottini, O. B., Aurich, C., England, G., & Grahofer, A. (2023). General and comparative aspects of endometritis in domestic species: a review. *Reproduction in domestic animals*, 58(2), 49-71.

Pascottini, O. B., Hostens, M., Dini, P., Van Eetvelde, M., Vercauteren, P., & Opsomer, G. (2016). Prevalence of cytological endometritis and effect on pregnancy outcomes at the time of insemination in nulliparous dairy heifers. *Journal of dairy science*, 99(11), 9051-9056.

Patel, B., Elguero, S., Thakore, S., Dahoud, W., Bedaiwy, M., & Mesiano, S. (2015). Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Human reproduction update*, 21(2), 155-173.

Paulson, E. E., & Comizzoli, P. (2021). Endometrial receptivity and embryo implantation in carnivores—commonalities and differences with other mammalian species. *Biology of reproduction*, 104(4), 771-783.

Payan-Carreira, R., Miranda, S. & Nizanski, W. (2011). Artificial Insemination in Dogs. In: M. Manafi (Ed.) *Artificial Insemination in Farm Animals* (1stEd., pp. 51-78). Rieka: InTech.

Pereira, M., Valério-Bolas, A., Saraiva-Marques, C., Alexandre-Pires, G., Pereira da Fonseca, I., & Santos-Gomes, G. (2019). Development of dog immune system: from in utero to elderly. *Veterinary sciences*, 6(4), 83.

Pires, M. A., & Payan-Carreira, R. (2015). Resident macrophages and lymphocytes in the canine endometrium. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(5), 740-749.

Pisello, L., Rampacci, E., Stefanetti, V., Beccati, F., Hyatt, D. R., Coletti, M., & Passamonti, F. (2019). Temporal efficacy of antimicrobials against aerobic bacteria isolated from equine endometritis: an Italian retrospective analysis (2010–2017). *Veterinary Record*, 185(19), 598-598.

Pollard, R. & Hecht, S. (2015). Female Reproductive Tract. *In: D. Penninck & M. Anjou (Eds.) Atlas of Small Animal Ultrasonography (2^aEd., pp. 403-421). Oxford: John Wiley & Sons, Inc.*

Praderio, R. G., Mitacek, M. G., Favre, R. N., Rearte, R., de la Sota, R. L., & Stornelli, M. A. (2019). Uterine endometrial cytology, biopsy, bacteriology, and serum C-reactive protein in clinically healthy diestrus bitches. *Theriogenology*, 131, 153-161.

Prior, S., & Arthurs, G. (2021). Bacterial infective stifle arthritis secondary to a migrating grass seed foreign body in an adult dog. *Veterinary Record Case Reports*, 9(3), e88.

Quartuccio, M., Biondi, V., Liotta, L., & Passantino, A. (2020). Legislative and ethical aspects on use of canine artificial insemination in the 21st century. *Italian Journal of Animal Science*, 19(1), 630-643.

Ravaioli, V., Raffini, E., Tamburini, M., Galletti, G., & Frasnelli, M. (2022). Infectious Endometritis in Mares: Microbiological Findings in Field Samples. *Journal of Equine Veterinary Science*, 112, 103913.

Rave, O., Assous, M. V., Hashkes, P. J., Lebel, E., Hadas-Halpern, I., & Megged, O. (2012). *Pantoea agglomerans* Foreign Body–Induced Septic Arthritis. *The Pediatric infectious disease journal*, 31(12), 1311-1312.

Reckers, F., Klopffleisch, R., Belik, V., & Arlt, S. (2022). Canine vaginal cytology: a revised definition of exfoliated vaginal cells. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 834031.

Reghini, M. F. S., Neto, C. R., Segabinazzi, L. G., Chaves, M. M. B. C., Camila de Paula, F., Bussiere, M. C. C., ... Alvarenga, M. A. (2016). Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology*, 86(2), 516-522.

Reynaud, K., Saint-Dizier, M., Tahir, M. Z., Havard, T., Harichaux, G., Labas, V., ... Chastant-Maillard, S. (2015). Progesterone plays a critical role in canine oocyte maturation and fertilization. *Biology of reproduction*, 93(4), 1-9.

Robinson, D. P., Hall, O. J., Nilles, T. L., Bream, J. H., & Klein, S. L. (2014). 17 β -estradiol protects females against influenza by recruiting neutrophils and increasing virus-specific CD8 T cell responses in the lungs. *Journal of virology*, 88(9), 4711-4720.

Rocha, M. F., Paiva, D. D., Amando, B. R., Melgarejo, C. M., Freitas, A. S., Gomes, F. I., ... & Castelo-Branco, D. S. (2022). Antimicrobial susceptibility and production of virulence factors by bacteria recovered from bitches with pyometra. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(9), 1063-1073.

Romagnoli, S. & Lopate, C. (2016). Reproductive Endocrinology and Breeding Husbandry of the Bitch. In: S. Ettinger, E. D. Feldman & E. Côté (Eds.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and the Cat* (8^aEd., pp. 4459-4492). St. Louis: Elsevier.

Rota, A., Corrà, M., Patuzzi, I., Milani, C., Masia, S., Mastroilli, E., ... & Losasso, C. (2020). Effect of sterilization on the canine vaginal microbiota: a pilot study. *BMC veterinary research*, 16(1), 1-10.

Rota, A., Vannozzi, I., Marianelli, S., Gavazza, A., & Lubas, G. (2015). Laboratory and clinical evaluation of a FEIA method for canine serum progesterone assay. *Reproduction in Domestic animals*, 51(1), 69-74.

Rua, M. A. S., Quirino, C. R., Ribeiro, R. B., Carvalho, E. C. Q., Bernadino, M. D. L. A., Junior, A. B., ... Barreto, M. A. P. (2018). Diagnostic methods to detect uterus illnesses in mares. *Theriogenology*, 114, 285-292.

Santos, N. R., Beck, A., Maenhoudt, C., Billy, C., & Fontbonne, A. (2021). Profile of Dogs' Breeders and Their Considerations on Female Reproduction, Maternal Care and the Peripartum Stress—An International Survey. *Animals*, 11(8), 2372.

Sasidharan, J. K., Patra, M. K., Singh, L. K., Saxena, A. C., De, U. K., Singh, V., ... Krishnaswamy, N. (2021). Ovarian cysts in the bitch: An update. *Topics in Companion Animal Medicine*, 43, 100511.

Scarlet, D., Malama, E., Fischer, S., Knutti, B., & Bollwein, H. (2023). Relationship between Clinical Uterine Findings, Therapy, and Fertility in the Mare. *Veterinary Sciences*, 10(4), 259.

Schäfer-Somi, S., Kaya, D., & Aslan, S. (2022). Prepubertal Use of Long-Term GnRH Agonists in Dogs: Current Knowledge and Recommendations. *Animals*, 12(17), 2267.

Singh, B. R., Singh, V. P., Verma, J. C., & Anand, A. (2004). An out break of equine abortion due to lecithinolytic *Enterobacter agglomerans* (*Pantoea agglomerans*). *Intas Polivet*, 5(2), 319-322.

Sreejith, K. R., Ooi, C. H., Jin, J., Dao, D. V., & Nguyen, N. T. (2018). Digital polymerase chain reaction technology—recent advances and future perspectives. *Lab on a Chip*, 18(24), 3717-3732.

Sugai, N., Werre, S., Cecere, J., & Balogh, O. (2023). Defining an Optimal Range of Centrifugation Parameters for Canine Semen Processing. *Animals*, 13(8), 1421.

Sugiura, K., Nishikawa, M., Ishiguro, K., Tajima, T., Inaba, M., Torii, R., ... & Inaba, T. (2004). Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology*, 209(8), 619-627.

Suzuki, H., Watanabe, H., & Abe, Y. (2022). Assisted reproductive techniques for canines: Preservation of genetic material in domestic dogs. *Journal of Reproduction and Development*, 68(1), 1-11.

Tamada, H., Kawate, N., Kawata, N., Inaba, T., Kida, K., Hatoya, S., ... Sawada, T. (2010). Detection of relaxin mRNA in the corpus luteum, uterus, and uterine cervix in the bitch. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(10), 1383-1386.

Tamiozzo, P. J. (2022). *Mycoplasma maculosum* and *Mycoplasma spumans* associated with fertility disorders in dogs from a Bernese Mountain dog kennel. *Revista Argentina De Microbiología*, 54(1), 39-42.

Taques, I. I. G. G., Barbosa, T. R., de Cássia Martini, A., Pitchenin, L. C., Braga, Í. A., de Melo, A. L. T., ... de Aguiar, D. M. (2016). Molecular assessment of the transplacental transmission of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella canis* and *Ehrlichia canis* in dogs. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 49, 47-50.

Tavares Pereira, M., Graubner, F. R., Rehrauer, H., Janowski, T., Hoffmann, B., Boos, A., & Kowalewski, M. P. (2019). Global transcriptomic analysis of the canine corpus luteum (CL) during the first half of diestrus and changes induced by in vivo inhibition of prostaglandin synthase 2 (PTGS2/COX2). *Frontiers in endocrinology*, 10, 715.

Tavares Pereira, M., Kazemian, A., Rehrauer, H., & Kowalewski, M. P. (2022b). Transcriptomic profiling of canine decidualization and effects of antigestagens on decidualized dog uterine stromal cells. *Scientific Reports*, 12(1), 21890.

Tavares Pereira, M., Papa, P., Reichler, I. M., Aslan, S., & Kowalewski, M. P. (2022a). Luteal expression of factors involved in the metabolism and sensitivity to oestrogens in the dog during pregnancy and in non-pregnant cycle. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(1), 86-97.

Teixeira-Soares, C. M., de Azevedo Viana, A. G., Ribeiro, I. M., Silva, K. D. P., Sancler-Silva, Y. F. R., & Machado-Neves, M. (2022). Comparison between gynecological examination methods and sample collection techniques for the diagnosis of endometritis in subfertile mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 119, 104147.

Thomassen, R., Sanson, G., Krogenaes, A., Fougner, J. A., Berg, K. A., & Farstad, W. (2006). Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology*, 66(6-7), 1645-1650.

Thompson, R. E., Premanandan, C., Pukazhenth, B. S., & Whitlock, B. K. (2020). A review of in vivo and in vitro studies of the mare endometrium. *Animal Reproduction Science*, 222, 106605.

Thomson, P., García, P., Río, C. D., Castro, R., Núñez, A., & Miranda, C. (2023). Antimicrobial resistance and extended-spectrum beta-lactamase genes in enterobacterales, *pseudomonas* and *acinetobacter* isolates from the uterus of healthy mares. *Pathogens*, 12(9), 1145.

Tomaso, H., Otto, P., Peters, M., Süß, J., Karger, A., Schamoni, H., ... & Hotzel, H. (2018). *Francisella tularensis* and other bacteria in hares and ticks in North Rhine-Westphalia (Germany). *Ticks and tick-borne diseases*, 9(2), 325-329.

Tsuchida, M., Komura, N., Yoshihara, T., Kawasaki, Y., Sakurai, D., & Suzuki, H. (2021). Ultrasonographic observation in combination with progesterone monitoring for detection of ovulation in labrador retrievers. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(2), 149-156.

Uchańska, O., Ochota, M., Eberhardt, M., & Niżański, W. (2022). Dead or alive? A review of perinatal factors that determine canine neonatal viability. *Animals*, 12(11), 1402.

Umar, T., Yin, B., Umer, S., Ma, X., Jiang, K., Umar, Z., ... Deng, G. (2021). MicroRNA: could it play a role in bovine endometritis?. *Inflammation*, 44(5), 1683-1695.

Usuga, A., Tejera, I., Gómez, J., Restrepo, O., Rojano, B., & Restrepo, G. (2021). Cryoprotective effects of ergothioneine and isoespintanol on canine semen. *Animals*, 11(10), 2757.

Verstegen-Onclin, K., & Verstegen, J. (2008). Endocrinology of pregnancy in the dog: a review. *Theriogenology*, 70(3), 291-299.

Watts, J. R., & Wright, P. J. (1995). Investigating uterine disease in the bitch: uterine cannulation for cytology, microbiology and hysteroscopy. *Journal of Small Animal Practice*, 36(5), 201-206.

Wojtysiak, K., Ryszka, W., Stefaniak, T., Król, J., & Kozdrowski, R. (2020). Changes in the secretion of anti-inflammatory cytokines and acute-phase proteins in the uterus after artificial insemination in the mare. *Animals*, 10(12), 2438.

Wolf, C. A., Maslchitzky, E., Gregory, R. M., Jobim, M. I. M., & Mattos, R. C. (2012). Effect of corticotherapy on proteomics of endometrial fluid from mares susceptible to persistent postbreeding endometritis. *Theriogenology*, 77(7), 1351-1359.

Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Squires, E. L., & Troedsson, M. H. T. (2012). Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: Relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology*, 78(3), 495-501.

Woźna-Wysocka, M., Rybska, M., Błaszak, B., Jaśkowski, B. M., Kulus, M., & Jaśkowski, J. M. (2021). Morphological changes in bitches endometrium affected by cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex—the value of histopathological examination. *BMC veterinary research*, 17, 1-11.

Xavier, R. G. C., Santana, C. H., da Silva, P. H. S., Paraguassú, A. O., Nicolino, R. R., Freitas, P. M. C., ... & Silva, R. O. S. (2023). Association between bacterial pathogenicity, endometrial histological changes and clinical prognosis in canine pyometra. *Theriogenology*, 214, 118-123.

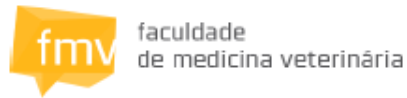
Zhang, Z., Li, T., Xu, L., Wang, Q., Li, H., & Wang, X. (2021). Extracellular superoxide produced by *Enterococcus faecalis* reduces endometrial receptivity via inflammatory injury. *American Journal of Reproductive Immunology*, 86(4), e13453.

Zheng, H. H., Du, C. T., Zhang, Y. Z., Yu, C., Huang, R. L., Tang, X. Y., & Xie, G. H. (2023). A study on the correlation between intrauterine microbiota and uterine pyogenesis in dogs. *Theriogenology*, 196, 97-105.

Ziraldó, R., Shoura, M. J., Fire, A. Z., & Levene, S. D. (2019). Deconvolution of nucleic-acid length distributions: a gel electrophoresis analysis tool and applications. *Nucleic Acids Research*, 47(16), e92-e92.

Apêndice

Apêndice A1: Formulário de Consentimento.



Apêndice 2

Formulário de Consentimento

· Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona ·

Eu, _____,
detentor do animal de nome _____, espécie _____, raça _____, sexo _____, de idade (anos) _____, com o número de identificação eletrónica _____, aceito que o animal participe no _____ projeto entitulado: _____, sob a supervisão do médico veterinário _____.

Declaro ter sido informado dos seguintes pontos:

- Que a participação é voluntária podendo o animal ser retirado a qualquer momento.
- Fui elucidado sobre os procedimentos.
- Os resultados do projeto e material audiovisual podem ser divulgados e publicados sem menção do nome do detentor do animal, do animal e do seu número de identificação eletrónica.

Por estar de acordo, assino o presente consentimento informado.

_____, ____ de _____ de 20____

Assinatura do detentor:

BI/CC n.º _____

Apêndice

Apêndice A2: Questionário realizado aos tutores.



1. Identificação:

Nome do tutor: _____

Nome do animal: _____

Número do animal: _____

Data de nascimento: _____

Raça: _____

Dono: Particular _____ Criador _____ Associação _____

2. Motivo da consulta:

Ovariohisterectomia/Ovariectomia ___ Inseminação artificial ___ Infertilidade ___

3. Data de início do último cio: _____

4. Fez seguimento de cio com medição da progesterona? _____

a. Valor: _____

5. Intervalo entre cios: <5m ___ 5-8m ___ >8m ___

6. Já foi cruzada? Não: _____. Sim _____

6.1. Se sim, data da última cruza: _____

6.2. Monta natural _____ Inseminação artificial: _____

Resultado da inseminação/monta _____

6.3. Por inseminação artificial:

- Local da inseminação: Intra-uterina _____ Intra-vaginal _____
- Tipo de sémen: Fresco _____ Refrigerado _____ Congelado _____

6.4. Número de inseminações: _____

6.5. O sémen do macho foi avaliado? Não: _____. Sim _____

Se sim:

- Motilidade _____ Espermograma completo _____
- Data (últimos 6 meses) _____
- Foi testado para *Brucella canis*? Não: _____. Sim _____

6.6. Diagnóstico de gestação:

Ecografia _____ Datas: _____; _____; _____

Número de embriões: _____ Número de reabsorções embrionárias: _____

Apêndice

Radiografia ____ Datas: _____; _____; _____

Número de fetos: _____ Número de fetos mortos: _____

6.7. Já esteve gestante anteriormente? Não: ____ Sim____, se sim número de gestações: _____

Data do parto					
Falha em conceber					
Reabsorções embrionárias					
Aborto					
Distocia					
Parto natural					
Cesariana					
Tamanho das ninhadas					
Nados-mortos					
Mortalidade neonatal (até 21 dias)					

7. Última vacinação:

Nomes: _____ Data: _____

Nome: _____ Data: _____

8. Última desparasitação:

Nome: _____ Data: _____

Nome: _____ Data: _____

9. Tratamentos hormonais:

Nome: _____ Data: _____

10. Aborto provocado:

Nome: _____ Data: _____

11. Medicação (glucocorticoides/antifúngicos) nos últimos 3 meses:

Nome: _____ Data: _____

12. Antibióticos (nos últimos 365 dias):

Não: ____ Sim____ se sim:

Nome: _____

Apêndice

Data de início: _____

Motivo: _____

Fez teste de suscetibilidade a antibióticos? Não _____ Sim _____

13. Esteve internada (nos últimos 365 dias)? Não: _____. Sim _____

Se sim quanto tempo? _____ e há quanto tempo
_____?

14. Esteve em contacto com outros animais (associação/casa)? _____
Quando? _____

15. Tem história de outras doenças? _____

Hipotiroidismo: _____

Hipoadrenocorticismo: _____

Hiperadrenocorticismo: _____

Diabetes mellitus gestacional: _____

Cetose de gestação: _____

Infeção urinária: _____ Urianálise: _____ Urocultura:

Outro: _____

Tratamento:

16. Fez despiste serológico de herpesvírus? Não: _____. Sim _____

Se sim, quando? _____

Gonçalo Palha

Aluno de Mestrado Integrado em Medicina

Veterinária -FMV-ULHT

2022/2023