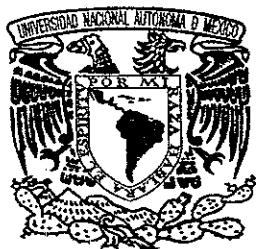


01669
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIO HORMONAL (PROGESTERONA Y
ESTROGENOS); CONTENIDO BACTERIANO;
HISTOLOGIA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
DE TRANSMISIÓN EN UTERO DE PERRAS CON
PIOMETRA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN PRODUCCIÓN ANIMAL:
REPRODUCCIÓN
P R E S E N T A:
GABRIELA PEREZ MEJÍA

ASESORES:

PhD. MVZ Rosa María G. Páramo R.

PhD. MVZ Guillermo Téllez I.

MPA. MVZ Carlos F. Esquivel L.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MÉXICO, D.F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Ciudad Universitaria

El presente trabajo se elaboró en las instalaciones del Departamento de Reproducción Animal; Departamento de Producción Animal: Aves y Departamento de Patología Animal en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. con el apoyo de:

Beca **“PROGRAMA DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN PARA 1995”**
Beca del **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA** (orden No. 5191 Y CM-27630)

Invierno del 2002.

DEDICO ESTA TESIS

A TI,MI DIOS.

Gracias por darme la fortaleza para concluir con este trabajo de investigación.

Que me has permitido vivir y disfrutar de todas las maravillas que me rodean.

Gracias por mi familia, mediante la cual me has dado la fuerza para seguir adelante.

...por permitir realizar todos los deseos y sobre todo lo feliz que hiciste a todos aquellos que ya no están con nosotros pero que sabemos están a tu lado Felices!!!!.

A ti, mi princesita (Natalia Jaqueline).

Por ser mi compañía en cada momento, porque esta tesis también es tu tesis (te recuerdo sentadita a mi lado jugando con tus muñecos y sonajas, mientras yo trabajaba en la computadora o leía mis artículos), porque la emoción me invade cuando te escucho hablar y me doy cuenta que las palabras se multiplican día a día en tu memoria (Mamá, mami, Papá, papi, eliz!, qué no!, eche!, globo, ela; entre cientos más); por ser el motor de mi vida!!!! Por tus besos y abrazos!!!! Por enseñarme lo maravilloso que significa el ser madre!!! Porque siempre seras mi bebé!!!

;;;Te amo!!!.

A mí Marido.

A mi mejor amigo!!!; Por tener la paciencia para apoyarme (ya sea con trabajo o compañía) durante toda la elaboración del trabajo de tesis, porque aun cuando estabas sumamente fatigado siempre estuviste y has estado a mi lado, porque eres el apoyo más grande de mi vida (en ocasiones el Papá y la “Mamá” de nuestra hija); Por tu mirada y tu sonrisa, Por tus palabras de amor!!!; Por tu calor!!!, por ser un hombre perfecto!!!; Por tu amor!!!. Por ser mi amigo y mi amor!!!.

;;;Te amo Migue!!!

A mis Padres.

Gracias por darme la vida, por mostrarme las cosas maravillosas de la vida y enseñarme el camino para llegar a ellas;

Gracias por dejarme volar con mis propias alas!!!,

Mami: Gracias por ser mi mejor amiga y mi confidente de toda la vida!!!. Por cuidar de mi Bebé siempre que lo he necesitado, por ser la madre de mi hija cuando yo por mis labores no he podido estar con ella.

Papi: Gracias por ser como eres!!! Admiro hasta donde has salido adelante luchando día a día!!!, Por el esfuerzo realizado que jamás olvidare, Gracias a tu ejemplo he salido adelante!!!.

Los amo!!!

A mis hermanos.

Toño y Mauri, la mejor compañía de la infancia, por salir adelante y ser también buenos padres.

Los amo!!!

A mis sobrinas y sobrino.

(Por estricto orden de nacimiento)

María Fernanda. Por llenar de amor la casa de mis papas con tu llegada y ser la maestra perfecta, la maestra de baile, dietista y doctora perfecta de tu hermana, tus primas y yo.

Claudia Jimena. Porque tu nacimiento inundo de amor a tus papás, con tus lindos ojos tapatíos y tus ojuelos en las mejillas y por amar muchísimo a tu papi (mi linda toñita).

Frida Sofía. Por ser la mejor compañía de mi hija, por ese amor infinito y cuidados que depositas a tu corta edad en ella y en mis papas. Por ser la mejor amiguita de Natalia.

Saúl Antonio. Al vivo retrato de mi Papá (Ubaldito chiquito), La dicha de mi hermano!!!.

Quienes ocupan un lugar muy especial en mi corazón.

A mi Suegro (†), suegra, Luis, Ángel y Ariana. Gracias por ser también mi familia, por ese apoyo que nunca me ha faltado de su parte, por ese inmenso amor que le dan a mi familia y principalmente a Natalia.

A mis amigas. Ivonne, Blanca, Jimena, Gabriela y Eduardo. Por esa amistad que ha perdurado a pesar de los años. Son mis mejores amigos!!!.

A Jorge (†) .

Mi gran amigo y hermano; mi confidente y mi compañía. Nunca olvidare nuestras charlas en el muelle o en la playa de Acapulco, tus cuidados y la gran responsabilidad que asumiste con mis papás en mi cuidado; jamás me dejaste con ganas de nada y aunque fatigado siempre me acompañabas y recorriamos todo Acapulco para conseguir algo que yo quería.

Te extraño!!!

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, donde pase los mejores años de mi vida.

A mi jurado dictaminador por toda su valiosa asesoría para la realización de esta tesis.

Al Dr. Luis Alberto Zarco Q. Por brindarme su apoyo y abrirme un espacio en su agenda a pesar de su gran carga de trabajo. Su valiosa asesoría fue de gran utilidad. Gracias por todo!!!.

A mis asesores.

A la Dra. Rosa María Páramo R. Por su apoyo y entusiasmo que no olvidaré y de quien aprendí algo nuevo. Su valiosa asesoría. Gracias por su paciencia y su gran amistad!!!

Al Dr. Guillermo Téllez I. Por su valiosa ayuda en la estadística de la tesis, por abrirme las puertas del Departamento de aves y hacerme sentir como en mi casa, por dedicarme su tiempo y asesoría mientras realice el trabajo de mi tesis.

Al Dr. Carlos Esquivel L. Por toda su ayuda en la realización de mi tesis, las fotos, las transparencias, su asesoría y su apoyo incondicional en todo momento.

A la MVZ., MSc. Ivonne Caballero Cruz y DRA. Martha Zentella de P. De la facultad de Medicina Humana de la U.N.A.M. por su valiosa asesoría de en la estadística y patología de esta tesis.

Los miembros del Departamento de Histología y Biología Celular, por su valiosa colaboración en la realización del material didáctico de esta tesis.

CONTENIDO

1. TITULO
2. RESUMEN
3. INTRODUCCIÓN
4. HIPÓTESIS
5. OBJETIVOS
6. MATERIAL Y METODO
7. RESULTADOS
8. DISCUSIÓN
9. LITERATURA CITADA

CONTENIDO

Contenido	I
Indice de figuras	IV
Indice de Cuadros	VI
Resumen	1
I. Introducción	3
II. Revisión de literatura	6
2.1 Anatomía del aparato reproductor de la hembra	6
2.2 Irrigación e inervación del aparato reproductor de la hembra	8
2.3 Endocrinología de la hembra canina	8
2.4 Piometra	11
2.5 Clasificaciones utilizadas para el estudio de la piometra	13
2.6 <i>Escherichia coli</i>	18
Hipótesis	20
Objetivos	21
III. Material y métodos	22
3.1 Localización	22
3.2 Animales	22
3.3 Diagnóstico	22
3.4 Tipo de presentación de la piometra	23
3.5 Citología vaginal exfoliativa	23

3.6 Etapa de diestro	23
3.7 Edad	23
3.8 Muestras sanguíneas	24
3.9 Bacteriología	24
3.10 Características del endometrio	25
3.11 Determinaciones Hormonales	25
17 β estradiol	25
Progesterona	26
3.12 Histología	26
Clasificación histológica	26
3.13 Microscopía electrónica de transmisión	26
Análisis estadístico	27
IV Resultados	28
4.1 Tipo de piometra	28
4.2 Citología vaginal exfoliativa	30
4.3 Edad de presentación de la piometra	30
4.4 Bacteriología	31
4.5 Características macroscópicas del endometrio	31
4.6 Determinaciones hormonales	33
Progesterona (ng/ml)	33
Estradiol (pg/ml)	34
4.7 Histología	35

4.8 Microscopía electrónica de transmisión	39
V Discusión	51
VI Conclusiones	61
VII Literatura citada	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Utero con piometra bilateral sin estrangulamientos con apariencia de embutido	29
Figura 2.	Mucosa engrosada con plegamientos poco profundos y de aspecto edematoso	32
Figura 3.	Endometrio sano	37
Figura 4.	Endometrio con piometra	37
Figura 5.	Utero con piometra (Hiperplasia tipo I).....	38
Figura 6.	Utero con piometra (Hiperplasia tipo III).....	38
Figura 7.	Utero con piometra (Hiperplasia tipo V).....	39
Figura 8.	Glándula endometrial de perra sana	42
Figura 9.	Glándula endometrial de perra con piometra	42
Figura 10.	Acercamiento de la glándula endometrial de perra sana	43
Figura 11.	Acercamiento de la glándula endometrial de perra con piometra	43
Figura 12.	Acercamiento del núcleo de una célula glandular endometrial de una perras sana	44
Figura 13.	Acercamiento del núcleo de una célula glandular endometrial de una perras con piometra.....	44
Figura 14.	Acercamiento de microvellosidades de una célula glandular endometrial de una perra con piometra, en donde se aprecia la forma irregular de las microvellosidades.....	45
Figura 15.	Forma no común de la microvellosidad.....	45

Figura 16.	Acercamiento de unión intracelular de glándula en perra sana.....	46
Figura 17	Acercamiento de unión intracelular de glándula en perra con piometra	46
Figura 18.	Miometrio de una perra sana	47
Figura 19.	Miometrio de una perra con piometra.....	47
Figura 20.	Acercamiento de una célula del miometrio de una perra sana	48
Figura 21.	Acercamiento de una célula del miometrio de una perra con piometra.....	48
Figura 22.	Endotelio vascular del miometrio de una perra sana.....	49
Figura 23.	Endotelio vascular del miometrio de una perra con piometra.....	49
Figura 24.	Apoptosis en endometrio de perra con piometra	50

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Clasificación de la piometra según Nomura	17
Cuadro 2.	Patogénesis de la piometra	18
Cuadro 3.	Relación de la presentación del cérvix (cerrado o abierto)	28
Cuadro 4.	Edad de presentación de la piometra	30
Cuadro 5.	Aislamientos bacterianos en perras sanas y perras con piometra	31
Cuadro 6.	Nivel sérico de progesterona en perras sanas y con piometra (ng/ml)	33
Cuadro 7.	Nivel sérico de estrógenos (E ₂) en perras sanas y perras con piometra (pg/ml)	34
Cuadro 8.	Tipos de hiperplasia glandular en perras con piometra	36

PEREZ MEJIA GABRIELA. Estudio hormonal (Progesterona y estrógenos); contenido bacteriano; histología y microscopía electrónica de transmisión en útero de perras con piometra. Bajo la dirección de: MVZ. , PhD. Rosa María Páramo R.; MVZ. , MVZ. , PhD. Guillermo Téllez I.; MVZ. , MPA. Carlos F. Esquivel L.

RESUMEN

Se tomaron muestras de 15 perras sanas (grupo testigo) y 15 perras con piometra espontánea (grupo problema). De ambos grupos se registró edad y tipo de presentación de la piometra. Posteriormente se tomó una muestra sanguínea previa a la cirugía de ovariectomía, para determinar niveles séricos de Progesterona (P_4) y 17β estradiol (E_2). Realizada la cirugía, se colectó muestra del contenido uterino para bacteriología, y de tejido endometrial para histología y análisis ultraestructural. Los resultados mostraron que la piometra se presentó en un 66.66% en perras menores de 6 años de edad. La *Escherichia coli* (*E. coli*) se aisló en un 86.66% (13 casos) del contenido uterino de perras con piometra, encontrando diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$) con respecto al grupo sano (6.66%). Únicamente 4 casos (26.66%) de perras con piometra presentaron Unidades Formadoras de Colonia de (*E. coli*) en tejido uterino. Los niveles séricos de P_4 tendieron a ser mayores en perras con piometra ($6.051 \pm 8.48 \text{ ng/ml}$) en comparación con perras sanas ($2.890 \pm 3.57 \text{ ng/ml}$), no encontrando diferencia significativa. El promedio del nivel sérico de estrógenos fue superior en perras sanas ($79.91 \pm 21.06 \text{ pg/ml}$) en comparación con perras con piometra ($31.84 \pm 19.41 \text{ pg/ml}$). La histología de perras con piometra mostró una marcada hiperplasia glandular tipo III (33.33%) y IV (33.33%), observándose células plasmáticas e infiltrado polimorfonuclear; piocitos en 7 casos (46.66%), linfocitos y macrófagos en 2 casos (13.33%).

En aquellos casos en los que la *E. coli* sólo estaba presente en contenido uterino, la hiperplasia observada fue de tipo de tipo II, III y IV. Cabe hacer mención que cuando estaba presente además la *E. coli* en tejido uterino, el daño histológico fue mayor, ya que se encontraron hiperplasias tipo IV y V, siendo solo en un caso tipo I. En la microscopía electrónica de transmisión se observó en perras con piometra adenosis, apoptosis, glándulas con núcleos pleomórficos y gran cantidad de vacuolas; así como microvellosidades de la mucosa endometrial con crecimiento y distribución irregular. En la membrana citoplásmica de las células del miometrio se observó un aumento de vesículas pinocíticas, y el endotelio en general mostró un engrosamiento y presencia de proyecciones citoplásmicas. Resultan interesantes los hallazgos encontrados en la microscopía electrónica, ya que hasta el momento no se han realizado estudios en útero de perras sanas ni perras con piometra. En este estudio se concluye que la piometra se puede presentar a cualquier edad reproductiva de las perras, que parece estar asociada principalmente a la presencia de *E. Coli*, y que las altas concentraciones de progesterona y bajas concentraciones de estradiol podrían favorecer el establecimiento de esta bacteria en el útero.

PÉREZ MEJIA GABRIELA. Study hormonal (Progesterone and estrogen); intrauterine bacteria; histology and electronic microscopy of transmission in uterus of dogs with pyometra. Under the direction of: MVZ., PhD. Rosa María Páramo R.; MVZ.; MVZ., PhD. Guillermo Téllez I.; MVZ., MPA. Carlos F. Esquivel L.

SUMMARY

They took samples of 15 healthy dogs (group witness) and 15 dogs with spontaneous pyometra (group problem). Of both groups she registered age and type of presentation of the pyometra. Later on she took a previous sanguine sample to the ovariectomized surgery, to determine progesterone (P4) concentrations in the blood and 17 β stradiol (E2). Carried out the surgery, sample of the uterine content was collected for bacteriology, and of having knitted endometrial for histology and analysis ultra-structural. The results showed that the pyometra was presented in 66.66% in dogs smaller than 6 years of age. The *Escherichia coli* (*E.coli*) it was isolated in 86.66% (13 cases) of the uterine content of dogs with pyometra, finding differs statistically significant ($P < 0.01$) with regard to the healthy group (6.66%). Only 4 cases (26.66%) of dogs with pyometra presented Colony Units of (*E.coli*) in uterine fabric. The progesterone concentrations in the blood spread to be bigger in dogs with pyometra ($6.051 \pm 8.48 \text{ ng/ml}$) in comparison with healthy dogs ($2.890 \pm 3.57 \text{ ng/ml}$), not finding significant difference. The average of the E2 concentrations in the blood was superior in healthy dogs ($79.91 \pm 21.06 \text{ pg/ml}$) in comparison with dogs with pyometra ($31.84 \pm 19.41 \text{ pg/ml}$). The histology of dogs with pyometra showed a marked endometrial hyperplasia type III (33.33%) and IV (33.33%), being observed cells plasmatic and infiltrated polymorphonuclear; leukocytes in 7 cases (46.66%), lymphocytes and macrophage in less than 2 cases (13.33%).

In those cases in those that the *E. coli* was only present in uterine content, the observed hyperplasia was of type type II, III, IV and I (only cas). It is necessary to make mention that when it was present the *E.coli* in uterine fabric, the damage histologic was bigger, since they were hyperplasias type IV and V. With the the electronic microscopy of transmission it was observed in dogs with pyometra, apoptosis, mitochondrias rounds, glands with nucleus of outline diverse and great quantity of secretory vesicles; as well as microvilli of the surface epithelial cell in endometrium with growth and irregular distribution. In the space inter-celular of the uterine muscle an increase of vesicles of pinocytosis, and the blood vessels was observed in general it showed an increase of endothelium and presence of projections from cytoplasm. They are interesting the discoveries found in the electronic microscopy, since until the moment they have not been carried out studies in uterus of healthy dogs neither dogs with pyometra. In this study you concludes that the pyometra you can present to any reproductive age of the dogs that seems mainly to be associate to the presence of *E. coli*, and that the high progesterone concentrations and low estrogen concentrations could to favor the establishment of this bacteria.

I. INTRODUCCIÓN

El estado físico de las hembras interfiere directamente en la producción, reproducción, salud y longevidad; ya que primero deben de satisfacer sus necesidades, para después poder llevar a cabo la producción y reproducción satisfactoriamente (1).

El ciclo reproductivo de las perras es de gran importancia económica para el criador, sin embargo, la reproducción canina algunas veces se ve alterada por la presencia de la piometra, la cual afecta a un porcentaje significativo de las perras, terminando con su capacidad reproductiva e incluso con la vida del animal, lo que causa molestias y gastos al propietario.

La piometra es un complejo de cambios patológicos, que se caracteriza por la presencia de hiperplasia quística glandular del endometrio y subsecuente acumulación de material purulento en la cavidad uterina (2). Es una patología que se presenta durante el diestro del ciclo estral en la perra, pero sabiendo que todas las perras pasan por esta fase del ciclo estral se desconoce porque algunas perras sufren de esta entidad patológica y otras no (3).

Anteriormente la piometra afectaba casi exclusivamente a hembras adultas de más de 6 años. Sin embargo, en años recientes, en los que se ha incrementado la utilización de hormonas como estrógenos, prostaglandinas y progestágenos para inhibir el estro o interrumpir la gestación, se presenta en hembras más jóvenes, algunas de apenas 2.7 años de edad (4, 5, 6, 7).

Se cree que la etiología de la piometra se debe a persistencia de cuerpo lúteo (8, 9), a la administración repetida de dosis altas de progesterona para terminar con la gestación no deseada (10). A desequilibrios de hormonas que inducen a su vez lesiones histológicas, y a cambios en el número y afinidad de receptores endometriales debidos quizás a un decremento en la expresión de los receptores para estrógenos en las glándulas del endometrio en perras afectadas con hiperplasia quística endometrial (11).

De perras con piometra se han aislado diferentes bacterias; sin embargo, la que más importancia representa por el daño que causa en esta patología es la *Escherichia coli*, la cual a sido aislada en más de un 60% de los casos por varios autores (5, 11, 12, 13, 14). Pero también se han aislado otras bacterias como *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas*; sólo que estos aislamientos se han observado en un menor porcentaje en el contenido de las perras estudiadas (5, 8, 14).

Dentro de los signos clínicos que la perra presenta, se pueden observar según el grado de relajación del cérvix (abierto o cerrado), depresión, polidipsia, poliuria, anorexia, vómito, abultamiento del abdomen (cérvix cerrado) y secreción vulvar (cérvix abierto) (2). Cuando la piometra se presenta con el cérvix cerrado, en diestro, se llega a confundir con una gestación; lo cual significa pérdidas económicas al dueño, tanto por la pérdida de las camadas que consideraba producir, y además porque se cambia el tipo de manejo que ordinariamente se le da a una perra no gestante, uno de esos cambios incluye la dieta, que en el caso de la perra gestante es más cara por ser de mejor calidad. Además el problema se torna más serio, porque se esta confundiendo una situación fisiológicamente normal como sería una gestación con una patología que puede traducirse en una pérdida ya no tan solo de

la productividad sino hasta de la vida del animal, ya que se llegan a dar cuenta de la presencia de la piometra hasta que el animal ya ésta muy enfermo y con un pronóstico nada favorable.

El diagnóstico de la piometra se puede realizar con la ayuda de diversos análisis de gabinete como son: radiografía y ultrasonido, en donde se observa el útero aumentado de tamaño y con contenido de material radio-opaco; citología vaginal exfoliativa, la cual permite observar los cambios celulares que se presentan durante el ciclo estral en la perra, ya que al presentarse la piometra durante el diestro, se espera ver en su mayoría células parabasales características del diestro (15, 16, 17); y química sanguínea la cual mostraría un posible daño en riñón, dando como resultado el aumento de creatinina sérica y de proteína total (2).

Algunos trabajos se han enfocado al estudio de la probable etiología de la piometra, para lo cual se han estudiado las concentraciones de estrógenos y progesterona (6, 10, 17, 18, 19, 20), relación de *Escherichia coli* con la presentación de la piometra (8,11, 13, 20, 21, 22).

El objetivo del presente trabajo fue describir a nivel ultraestructural las lesiones tisulares que se presentan durante la piometra, evaluando su relación con la presencia de distintos agentes etiológicos, así como las concentraciones de hormonas esteroides circulantes.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Anatomía del aparato reproductor de la hembra

El aparato reproductor de la hembra esta formado por los órganos internos y externos:

- Órganos internos: 2 ovarios, 2 tubas uterinas, útero, cérvix, vagina y vestíbulo vaginal.
- Órganos externos: clítoris y vulva (23, 24).

En la cavidad abdominal los órganos reproductivos se sostienen gracias al ligamento ancho, el cual está unido a la parte craneal de la vagina y se continúa con el mesovario que sostiene al ovario, el ligamento mesosalpinx sostiene al oviducto y el ligamento mesometrio sostiene al útero (24, 25, 26, 27).

2.1.1 Ovarios

En las hembras caninas los ovarios son pequeños de forma oval alargados y aplanados. Presentan una longitud media de 2cm. encontrándose situados de 1.5 a 2.5 cm caudales al riñón a la altura de las vértebras lumbares: LIII y LIV (24, 25, 26, 27). Los ovarios se encuentran completamente envueltos con una bolsa peritoneal, la cual se conoce como bolsa ovárica, esta presenta una hendidura que se abre centralmente. La bolsa ovárica se continúa con el mesosalpinx y el ligamento propio del ovario, conocido como mesovario (24, 25, 27).

2.1.2 Oviductos

Los oviductos son tubulares, con una longitud de entre 5 a 8 cm. Al principio cursan cranealmente por la parte lateral de la bolsa ovárica y caudalmente por la parte medial de la misma; la cual es ligeramente flexible. Su fimbria asienta en la bolsa ovárica y parte de ella protuye a través de la abertura de la bolsa. Los oviductos están formados por 3 porciones:

Infundíbulo: Tiene forma de embudo, está próximo al ovario, y es el encargado de captar al ovocito cuando éste es liberado.

Ampula: Es la porción media del oviducto y su lumen es de diámetro más amplio al del istmo, en este sitio ocurre la fertilización.

Istmo: Es el extremo caudal del oviducto, que se une al útero por medio de un orificio muy pequeño (24, 25, 27).

2.1.3 Útero

El útero de la perra es bicornual. El cuerpo del útero es muy corto, pero presenta unas tubas uterinas extremadamente largas (en una perra de talla mediana el cuerpo del útero mide en promedio 2 a 3 cm y las tubas uterinas 12 a 15 cm de largo), las tubas uterinas presentan un diámetro uniforme, siendo casi rectas y situándose totalmente dentro del abdomen. Histológicamente el útero está formado por una capa serosa o perimetrio, una capa muscular o miometrio y una capa mucosa o endometrio, encontrándose en ésta última glándulas tubulares simples (23, 24, 25, 27).

2.1.4 Cérvix

El cérvix separa al útero de la vagina evitando el contacto del lumen uterino con el exterior (excepto durante el estro y el parto) (24, 25, 26, 27).

2.1.5 Vagina

La vagina es relativamente grande, estrecha cranealmente, se encuentra situada entre el cérvix y el vestíbulo (24, 25).

2.1.6 Vestíbulo

El vestíbulo vaginal conecta la vagina y la entrada de la uretra con la abertura genital externa. La perra carece de glándulas vestibulares mayores(24, 25, 27).

2.1.7 Clítoris

El clítoris se localiza en la parte ventral de la entrada del vestíbulo, el cuerpo del clítoris es ancho y plano, tiene de 3 a 4 cm de longitud en un animal de talla media, no presenta estructuras eréctiles, esta infiltrado de grasa (24, 25).

2.1.8 Vulva

La vulva esta compuesta por dos labios gruesos que forman una comisura ventral puntiaguda. Presenta un músculo constrictor de la vulva el cual es relativamente débil, que continúa dorsal con el esfínter anal externo y rodeando a la vulva y al vestíbulo (24, 25).

2.2 Irrigación e inervación del aparato reproductor de la perra

La irrigación esta dada por ramas de la arteria pudenda interna:

- a) Arteria y vena urogenital. - rama craneal forma la arteria y vena uterina.
- rama caudal forma la arteria y vena vaginal.
- b) Arteria y vena perianal.
- c) Arteria y vena del clítoris.
- d) Arteria y vena vestibular.
- e) Arteria y vena ovárica.

La inervación esta dada por el nervio perianal y el nervio dorsal del clítoris: ramas provenientes del nervio pudendo. Estas ramas se distribuyen por útero, vagina, vestíbulo, vulva, labios y clítoris (24, 25, 26).

2.3 Endocrinología de la hembra canina

2.3.1 Ciclo estral de la perra

La perra tiene un ciclo estral de tipo monoéstrico, presentando algunas razas 2 y otras 3 ciclos por año (28, 29). Este ciclo se divide en 4 etapas: Proestro, estro, diestro y anestro (28, 29, 30).

2.3.2 Proestro

Se caracteriza por ser la fase durante la cual la hembra presenta edema vulvar, mucosa vaginal rosa pálida, secreción vaginal sanguinolenta, micción frecuente, atracción al macho sin aceptación. Esta etapa dura de 3 a 20 días y termina con la entrada del estro (aceptación al macho) (29). Durante el proestro, el 17β estradiol (E_2) se incrementa desde 7 pg/ml hasta alcanzar 70 pg/ml un día antes del pico máximo de hormona luteinizante (LH) (28, 29, 31). El pico de LH se presenta 24 a 48 hrs. antes de la ovulación, alcanzando en el primer estro 23.1 ± 4.2 ng/ml y en estros posteriores hasta 51.6 ± 6.9 ng/ml (30).

2.3.3 Estro

La duración del estro es de 3 a 20 días, sus signos son: edema vulvar, mucosa vulvar rosa pálida, secreción vaginal, la cual puede seguir siendo sanguinolenta y tornarse en algunas perras amarillo-pajiza. Durante el estro la perra atrae y acepta al macho. El estro termina cuando la hembra deja de ser receptiva (26, 29).

La ovulación se produce 24 a 48 horas después del pico de LH (5, 32). En esta especie existe una secreción preovulatoria de P_4 , la cual proviene de la luteinización de los folículos preovulatorios. Según los trabajos de Concannon (30), la concentración de P_4 en plasma el día anterior a la ovulación, es de 0.8 ng/ml., el día de la ovulación 1.6 ng/ml y un día después de la ovulación 2.6 ng/ml. Para esta misma etapa, Hadley (10) informa haber encontrado niveles de P_4 circulante al principio del estro de 0.2ng/ml y al final de 0.6ng/ml.

2.3.4 Diestro

Este período tiene una duración promedio de 100 días en la perra vacía, reduciéndose a 63 días en la perra gestante. El diestro inicia al terminar el estro y termina con la regresión del cuerpo lúteo. En esta etapa se observa plegamiento vulvar, no hay secreción vaginal, la mucosa vaginal se encuentra pálida con pliegues longitudinales (29).

Para el día 25 de diestro la concentración de P_4 alcanza los 22.9 ng/ml en un ciclo normal y para el día 30 disminuye a 19.9 ng/ml. Hasta aquí no se observan diferencias significativas en la histología entre un útero grávido y uno no grávido (10); sino hasta después del día 30 de

diestro, que es cuando normalmente en la hembra con útero vacío baja la concentración de P₄ en plasma sanguíneo hasta a menos de 1 ng/ml (5). En cambio, en una hembra con útero ocupado ya sea por gestación o por una piometra las concentraciones de P₄ continúan elevadas, bajando al momento del parto en una hembra gestante al día 60; o continuando elevada aún después del día 60 en hembras con piometra (10, 30, 31, 32, 33).

2.3.5 Anestro

El anestro dura de 3 a 9 meses, tiempo durante el cual la vulva se encuentra plegada, la mucosa vaginal se encuentra pálida con pliegues longitudinales, no hay secreción vaginal ni atracción al macho (26, 28, 29). Los niveles de E₂ y P₄ se encuentran en su etapa basal.

2.3.6 Estrógenos

Esta hormona esteroide es producida en el ovario en las células de la teca interna y granulosa del folículo (26). Los efectos del estrógeno incluyen manifestaciones conductuales, como la receptividad al macho, así como crecimiento del epitelio glandular del endometrio, cambios histológicos en el epitelio vaginal, inducción de diapédesis de eritrocitos hacia la luz uterina durante el estro (5, 31, 34, 35). Además los estrógenos inducen una sensibilización del útero a los efectos de la P₄ al inducir la formación de sus receptores (5, 6, 30, 34).

Durante el proceso del parto los estrógenos potencializan los efectos de la oxitocina y prostaglandinas en el miometrio (35).

2.3.7 Progesterona (P₄)

Esta hormona esteroide, se produce también en el ovario, en las células grandes del cuerpo lúteo (26, 36). Actúa mediante receptores intracelulares en sus órganos blanco (37). Los complejos progesterona-receptor están asociados a sitios de ligaduras nucleares, la síntesis del receptor de P₄ depende de la acción de los estrógenos, y al parecer es posible que la P₄ desensibilice al útero de los efectos de los estrógenos (38). Dentro de las funciones que tiene la P₄ durante el diestro está: estimular junto con los estrógenos el crecimiento del epitelio glandular uterino y de glándula mamaria, así como mantener el cérvix cerrado. Se ha observado que si antes de aplicar exógenamente P₄ se les aplica E₂ a las perras, estas hembras

presentan una respuesta estimuladora endometrial con dosis bajas de P₄ (39). Durante la gestación la progesterona estimula a las glándulas endometriales para producir la leche uterina que sostiene al embrión.

Además, por ser una hormona con propiedades inmunosupresoras mantiene la gestación al impedir que el contenido uterino sea rechazado (6, 10, 26).

En la perra la administración prolongada de P₄ exógena provoca hiperplasia quística glandular, misma que se observó al utilizar múltiples aplicaciones de acetato de medroxiprogesterona para posponer el estro (8, 37), provocando una marcada estimulación del endometrio, dando por resultado un aumento de tamaño y peso del útero ocasionados por una hipersecreción endometrial (30, 35, 36, 37). En 1958 Dow (8) y en 1974 Sokolowski (38) y Zimbelman, observaron que a mayor cantidad de P₄ administrada exógenamente, aumentaba el número de quistes y se incrementaba la reacción inflamatoria en el endometrio, y que esta endometritis era parecida a la que se presenta cuando ocurre un diestro natural.

Una de las formas de medir la capacidad funcional del cuerpo lúteo, es a través de la medición de P₄ por medio de la técnica de Radioinmunoensayo (39). Estas mediciones se pueden realizar tanto en plasma cómo en suero o en leche (40).

2.4 Piometra

En la actualidad se ha incrementado la incidencia de piometra en perras jóvenes a las que se les han inyectado estrógenos con el fin de evitar gestaciones después de la monta no deseada (2, 5, 41). En éstos casos se ha sugerido que la alteración de los niveles fisiológicos normales tanto de P₄ como de estrógenos es la causa determinante que desencadena la disfunción uterina (5, 6, 41).

En la mayoría de los casos de piometra espontánea se ha observado que la presentación de piometra se acompaña de hiperplasia quística endometrial, debido a la estimulación hormonal

al tejido uterino (8, 36, 41). Esto también ocurre de manera similar en el caso de la utilización de progestagenos sintéticos (20, 30, 35, 36, 37, 42, 43).

En perras con piometra, los niveles de P₄ se encuentran aparentemente normales antes del día 30 de diestro (19, 29, 30, 33).

El complejo hiperplasia quística endometrial-piometra se considera un defecto endócrino que afecta la fertilidad de la perra y que se presenta únicamente cuando la hembra está en diestro (2, 4, 12, 42, 44). En este complejo, el factor importante es el grado de apertura y relajación del cérvix. Cuando el cérvix esta relajado y abierto el signo característico es la secreción vaginal; pero en el caso de que el cérvix permanezca cerrado el animal presenta distensión abdominal, anorexia, depresión, poliuria y polidipsia. En grados más severos hay presencia de vómito y septicemia (8, 21, 45). Otro dato interesante es que puede presentarse sin haber recibido cruza.

En cuanto a endocrinología se refiere, Dow (8), encontró que la administración prolongada de P₄ exógena, provoca una hiperplasia quística glandular a nivel endometrial, la cual evoluciona hasta causar piometra. El complejo hiperplasia quística endometrial-piometra se ha clasificado en 4 tipos, mismos que se describen brevemente más adelante.

El hecho de que la piometra se presente generalmente durante el diestro, cuando las concentraciones de P₄ son elevadas, aunado al conocido efecto del desarrollo de hiperplasia quística y piometra en respuesta a la administración de progestágenos exógenos, sugiere que la piometra se desarrolla como respuesta a niveles excesivos de P₄ exógena o endógena circulante. También es posible que la piometra no sólo sea el resultado de un exceso de progesterona, sino de una respuesta anormal a la hormona por parte del endometrio (6, 46, 47). Existe una gran semejanza entre los niveles de P₄ en hembras gestantes y con piometra hasta el día 60; pero después este período en la perra sana ocurre el parto y sus niveles de progesterona disminuyen, lo cual no ocurre en las perras con piometra, en las cuales continua la concentración de progesterona igual aun después del día 60 de diestro (6, 29, 30).

En investigaciones bacteriológicas en perras con piometra realizadas por Dow (8), así como por Christiansen y Schmidt (32), se observó que en el contenido del útero de una perra con piometra

es común encontrar contaminación con *Escherichia coli* (*E. coli*), aun cuando en algunas hembras con piometra el contenido uterino es estéril (4, 5, 8, 48, 49).

Lo que hace más crítico el problema de la piometra, es que por lo general se deja avanzar hasta grados muy severos antes de ser diagnosticada, ya que se presenta durante el diestro, por lo que el aumento del volumen abdominal se confunde con una gestación (10, 45).

La piometra inutiliza al animal como reproductor, y en grados avanzados puede incluso ocasionar la muerte por septicemia, glomerulonefritis e inclusive una peritonitis ocasionada por ruptura uterina (4, 5, 6, 8, 28, 46). De ahí la importancia de ser diagnosticada a tiempo y de ser posible evitar una posible contaminación bacteriana durante el estro.

En el diagnóstico de la piometra el uso de la citología vaginal exfoliativa es una técnica muy utilizada en las perras para determinar la etapa del ciclo estral en que se encuentran ya que por comportamiento o signos externos esto no resulta muy claro, pues no se correlacionan en forma precisa dichos cambios con los eventos hormonales que se están llevando a cabo (16, 17, 50).

2.5 Clasificaciones utilizadas para el estudio de la piometra

2.5.1 CLASIFICACION DE LA PIOMETRA SEGÚN DOW

La clasificación de la piometra según Dow (8) es de 4 tipos:

Tipo I

Hiperplasia endometrial quística: Ocurre en perras de mediana edad. El endometrio se encuentra engrosado y marcado con numerosos quistes translúcidos sin producción de pus. No tiene una signología acentuada (2, 8). La acumulación de secreciones y falta de contracciones, resulta ser un ambiente ideal para la proliferación de bacterias oportunistas, que ya se encontraban en el útero, o que durante la monta hayan penetrado de la vagina hacia el útero (6). Del moco presente en el lumen uterino de perras con piometra, se ha aislado principalmente la bacteria *E. coli*, la cual se menciona que tiene una alta afinidad por el epitelio urinario y

tropismo hacia los receptores endometriales para la progesterona (4, 5, 6, 8, 51, 52). La *E. coli* se ha aislado de la vagina de hembras sanas, pudiéndose considerar parte de la flora vaginal normal (53, 54, 55).

Tipo II

Los signos que presenta el animal son malestar, anorexia, secreción vaginal de fluido mucoso que varía de un tono claro hasta color rojizo y edema vulvar (8).

El cérvix comúnmente esta abierto. El lumen uterino contiene poca cantidad de mucosidad clara a rojo pálido (5, 6, 21, 46, 47).

Hay una hiperplasia endometrial quística con infiltración difusa de células plasmáticas. Se ha detectado la presencia de *E. coli* y *Staphylococcus sp.* (8).

Tipo III

Ocurre en los primeros 40 días de diestro. La hiperplasia endometrial quística se acompaña de una reacción inflamatoria aguda del endometrio; el tamaño del utero y los signos clínicos dependen del estado de relajación del cérvix, puede haber una descarga vaginal visible, la cual puede ser intermitente (8).

Únicamente en el caso de la piometra abierta, en los frotis vaginales se observan muchos neutrófilos con células vaginales características del diestro.

Las bacterias aisladas son: *E. coli*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

Tipo IV

Se observa una endometritis crónica en la cual el cérvix puede estar abierto o cerrado. Si el cérvix esta abierto se presenta una secreción vaginal crónica, los cuernos uterinos no se encontraran aumentados de tamaño pero sus paredes estarán engrosadas con hipertrofia miometrial y fibrosis, en donde existirá pus en pequeñas cantidades. Si el cérvix esta cerrado, el útero se encontrará muy distendido con paredes delgadas; el endometrio está atrofiado existiendo un infiltrado de linfocitos con células plasmáticas. Frecuente, los síntomas se exacerban según la edad del animal y la duración de la piometra (8).

Se encuentran en contenido uterino las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus β -haemolytico* (5, 8, 32, 56), y en algunas ocasiones *Proteus sp.* (5, 28, 46).

2.5.2 CLASIFICACION SEGUN JOHNSON

A pesar de que observó diversos grados de piometra, Johnson (49) la clasifico en 2 tipos únicamente:

Piometra abierta

Es aquella en la que el cérvix permanece abierto, se observa una secreción vaginal que puede ser mucosa a mucopurulenta, esta descarga evita que haya un aumento de volumen abdominal.

Piometra cerrada

En este tipo de piometra el cérvix permanece cerrado, no se observa secreción vaginal, dando como resultado una signología más clara, en donde se aprecia un aumento en el volumen abdominal.

2.5.3 CLASIFICACION SEGUN RIECK

El investigador Rieck (46) le llamo complejo hiperplasia-endometrial y divide la piometra en 3 tipos:

Tipo 1

Piometra típica o endometritis crónica purulenta acompañada con zonas atróficas.

Tipo 2

Piometra en donde el útero comienza a perder su forma normal, hay evacuación espontánea del contenido uterino. Endometritis crónica purulenta con presencia de hiperplasia.

Tipo 3

La piometra ocasiona que el útero presente formas persistentes en su anatomía e histología, en donde el carácter reversible de la entidad no es posible a causa del extenso daño en las capas mucosa y muscular del útero.

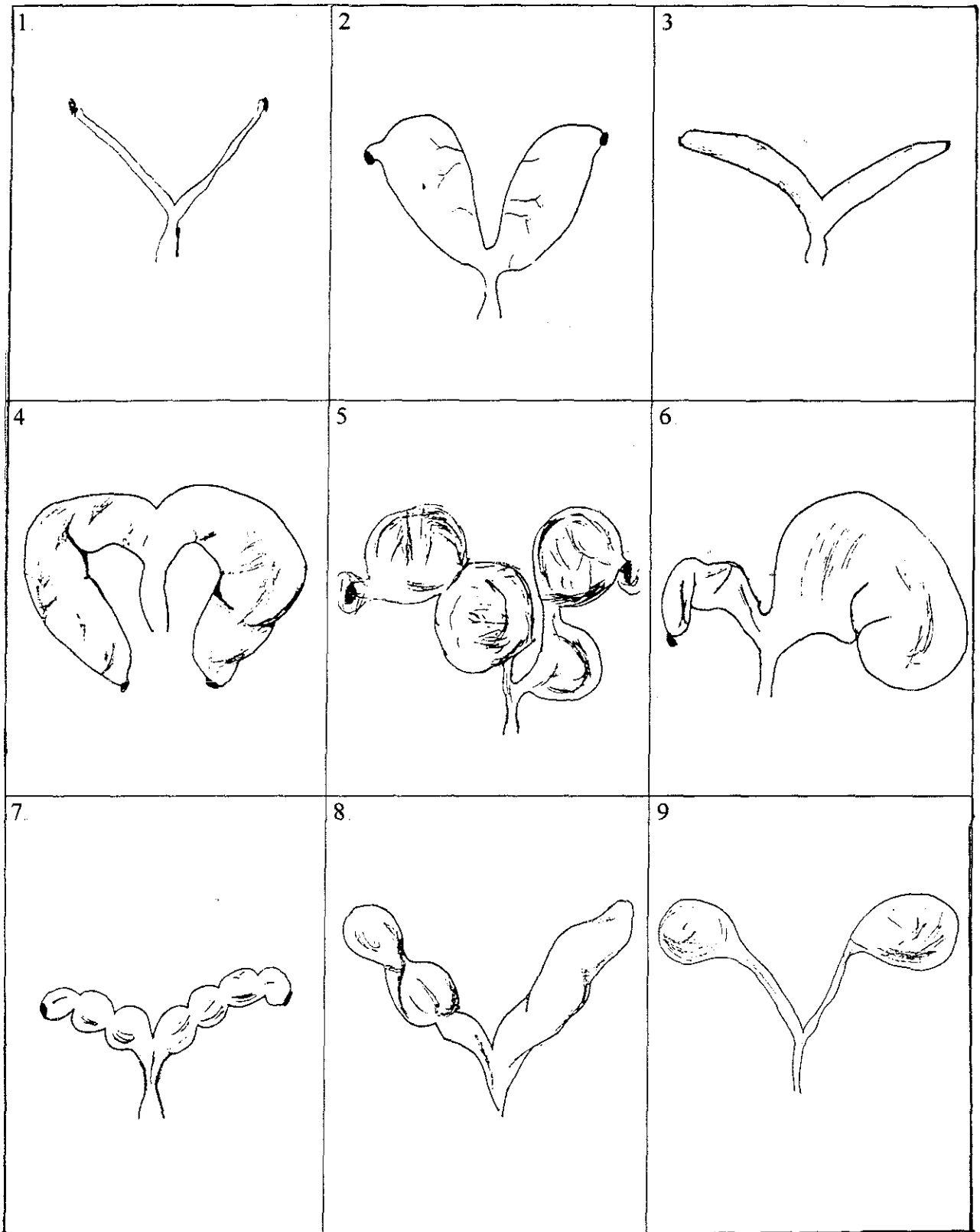
2.5.4 CLASIFICACION MACROSCOPICA SEGÚN NOMURA

Nomura (44) clasificó a la piometra según la forma que presentaba el útero, en nueve categorías (Ver cuadro 1):

- 1.- Apariencia normal. Semejante al útero sano.
- 2.- En forma de dos peras invertidas, esto es cuernos pletóricos muy dilatados de la parte media craneal sin estrangulamientos.
- 3.- En forma de dos salchichones, tubas uterinas pletóricas dilatadas en toda su extensión sin estrangulamientos.
- 4.- Tubas uterinas pletóricas, dilatadas en forma de salchichón con 1 estrangulamiento ligero en cada tuba.
- 5.- Tubas uterinas pletóricas, en forma de salchichón con más de 2 estrangulamientos; semejando una gestación en su ultimo tercio.
- 6.- Forma mixta; una tuba uterina pletórica dilatada sin estrangulamiento y la otra tuba también dilatada pero con dos o más estrangulamientos.
- 7.- Ambas tubas uterinas pletóricas con más de dos estrangulamientos, semejante a un chorizo.
- 8.- Forma mixta en donde una tuba uterina presenta varios estrangulamientos bien marcados y la otra presenta dilatación con estrangulamientos poco definidos.
- 9.- Presenta una dilatación en la parte craneal de las tubas uterinas, siendo el resto de apariencia normal.

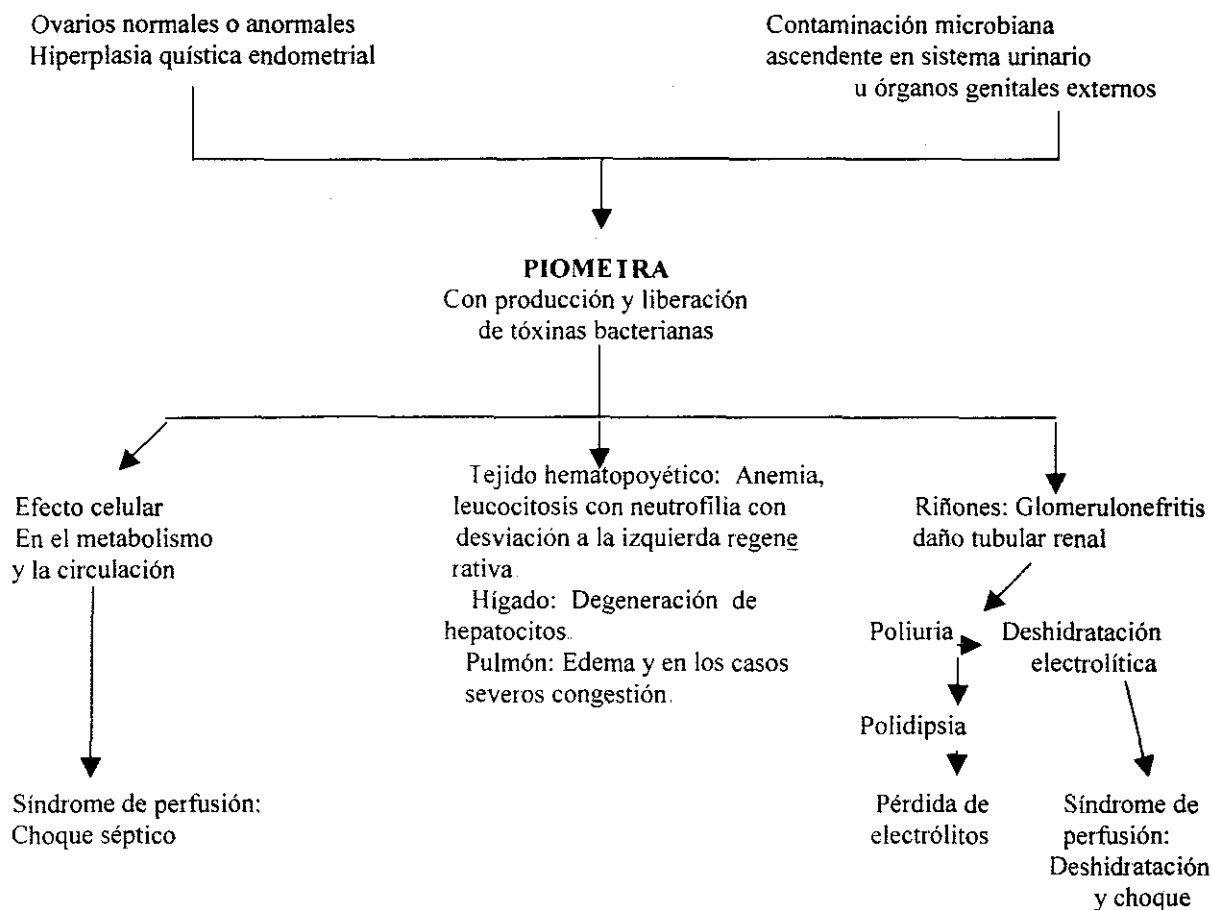
Cabe mencionar que Nomura (44) cree que la forma de la piometra varía con el grado patológico de la misma; empezando con una apariencia normal y continuando sucesivamente la dilatación hasta alcanzar una forma pletórica, muy dilatada sin estrangulamientos e inclusive si la piometra no es atendida, se puede llegar a reventar el útero causando una peritonitis.

Cuadro 1. Clasificación de la piometra según Nomura (44)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. PATOGÉNESIS Y PATOFISIOLOGÍA DE LA PIOMETRA



Tomado y modificado de: Bergljot Borrensen (4) Nord. Vet.- Med. 1975, 27, 508-517

2.6 *Escherichia coli* (bacilo del colón)

Esta bacteria fue aislada por primera vez en 1885 a partir de heces de niños. Se trasmite por el agua y alimentos contaminados por materia fecal. Es un bacilo corto de 0.5μ por $1.0-3.0\mu$ variando de formas cocoides hasta filamentosos (53). Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es una enterobacteria Gram negativa (rojo), tiene membrana externa cuya constitución es similar a cualquier otra membrana biológica (fosfolípidos y proteínas) y posee un alto grado de endotoxinas

(lipopolisacáridos), es un organismo que no presenta agrupación definida, es facultativo, móvil y posee cápsula (53, 56).

Las enterobacterias son habitantes del tracto gastrointestinal de animales y hombre. Son eliminadas por heces. Al presentar cápsula bacteriana, esta le permite resistir el paso del tracto intestinal, ascienden por e invaden el tracto genito-urinario, adhiriéndose a la mucosa y proliferando en ella (53, 56).

La *E. coli* puede actuar como un patógeno oportunista. Provoca un infiltrado de células inflamatorias y lesiones de moderadas a severas. Tiene factores de urovirulencia (UVFs), provoca fibrosis, hemorragia e invasión a tejidos y riñón, provocando además en este último necrosis papular (51, 52, 54). Esta bacteria se considera productora de exudados purulentos. Durante el periodo agónico de muchas enfermedades, invade sangre y produce septicemia (52, 54).

Produce enterotoxinas, una termolábil y una termoestable, ambas poseen un plásmido determinado; La termolábil (ETEC) se ha demostrado que tiene la habilidad de estimular tejidos glandulares endócrinos como son glándulas intestinales y producir cambios morfológicos en el tejido (11). Ciertos serotipos tienen un tropismo intestinal; pero la toxina enteropatógena (EPEC) degrada el epitelio intestinal, aparentemente, poseen un ensamble de genes específicos reagrupados sobre el cromosoma bacteriano formando un islote de patogenicidad denominado LEE (foco de ataque enterocítico), y capaz de provocar la aparición de una lesión histológica, denominada lesión de ataque, caracterizada por la desaparición de microvellosidades de enterocitos y por el ataque íntimo de la bacteria en la membrana citoplasmática (54, 55).

Recientemente las cepas EPEC han sido identificadas gracias a la utilización de sondas genéticas en una colección de cepas de *E. coli* de origen canino y felino (55).

Aun cuando se han realizado antibiogramas específicos para *E. coli* en donde se ha observado que esta bacteria es sensible a la gentamicina y ciprofloxacina (49, 53), estos antibióticos no se pueden utilizar durante el período de diestro ya que si hubiera una gestación producirían daños teratogénicos a los fetos.

HIPÓTESIS.

Los niveles plasmáticos de progesterona se encuentran más elevados en hembras con piometra que en hembras sanas.

Los niveles de estrógenos se observan más elevados en perras sanas que en perras con piometra.

La *Escherichia coli* daña la histología del endometrio.

La arquitectura celular de glándulas endometriales se altera en perras con piometra.

OBJETIVOS.

Identificar en el contenido uterino la presencia de *Escherichia coli* y realizar una correlación con el daño histológico observado.

Conocer los cambios hormonales (17 β estradiol y progesterona) y su relación con la presencia bacteriana en perras con piometra.

Identificar los cambios ultraestructurales en el útero de perras con piometra con relación al de perras sanas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

El trabajo se llevó a cabo en los Departamentos de Reproducción e Inseminación Artificial, Patología y Producción animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.2 ANIMALES

Para este estudio se seleccionó a un grupo de 15 perras sanas (grupo testigo) y un grupo de 15 perras con piometra, en ambos grupos se verificó que estuviesen en etapa de diestro, que tuvieran dueño y provinieran del área metropolitana de la Ciudad de México D.F. La selección de las hembras tanto sanas como enfermas se hizo al azar de acuerdo al método utilizado por Chaffaux and Thibier (20).

Las 15 perras sanas (grupo testigo) se llevaron a clínicas veterinarias para que se les efectuara la Ovariohisterectomía (OVH) por no desear su reproducción. Las perras con piometra, se obtuvieron de la misma manera, pero en su caso se presentaron con signos de enfermedad. A los propietarios de estas perras se les solicitó la donación de los úteros extirpados para que formaran parte de éste estudio.

3.3 DIAGNÓSTICO

Las perras con piometra fueron inicialmente diagnosticados por su médico veterinario zootecnista de acuerdo a los signos clínicos: abdomen distendido, polidipsia, poliuria, depresión y además secreción vaginal en las de cérvix abierto, confirmando por citología vaginal exfoliativa, rayos X o ultrasonido, para entonces ser referidas al Departamento de Reproducción Animal y ser incluidas en esta investigación.

En las perras sanas y enfermas se determinó el diestro por medio de citología vaginal exfoliativa (16, 17, 50).

3.4 TIPO DE PRESENTACION DE PIOMETRA

Se registró el tipo de piometra que presentó cada animal de acuerdo a la clasificación de Johnson (49), ya sea presentación con cérvix abierto o cerrado. Y de acuerdo a la clasificación de Nomura (41), en cuanto a distribución de la secreción en el útero: en uni o bilateral, así como las características macroscópicas del útero de acuerdo al cuadro No 1.

3.5 CITOLOGIA VAGINAL EXFOLIATIVA

Las muestras se tomaron por medio de un hisopo de plástico flexible, con punta de algodón, de 15 cm de largo y estéril. Estas células se depositaron en una laminilla de vidrio, rodando el hisopo en 3 líneas diferentes a lo largo de la misma. El siguiente paso consistió en fijar éste frotis con alcohol de 96° por un período de 10 minutos. Posteriormente se procedió a teñirla, utilizando la tinción de Diff Quick. Se observó y evaluó en el microscopio con el objetivo de 20x.

3.6 ETAPA DE DIESTRO

Los días de diestro se tomaron en cuenta para que en ambos grupos hubiesen perras en la misma etapa de acuerdo a la información de Linde Forsberg (57) de que el diestro inicia 9 días después del cese del sangrado vaginal. Esto se confirmó con la citología vaginal tomando ese día como día cero.

3.7 EDAD

La edad se registró en tres categorías: perras de entre 10 meses a 2 años, perras de 3 a 6 años y perras de más de 7 años; para determinar el número y porcentaje de perras que presentan la piometra a edad temprana.

3.8 MUESTRAS SANGUÍNEAS.

A las perras se les tomó una muestra de sangre de 3 ml antes de la cirugía (39, 58), tomándose de la arteria antebraquial con un Vacutainer* sin anticoagulante (20, 39). Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos para separar el plasma del paquete celular, congelándose a -20°C hasta su análisis.

Por problemas en el suministro eléctrico de los congeladores en que se encontraban las muestras de suero, se dañaron algunos viales. Por esta razón solamente se pudieron medir las concentraciones de progesterona en 14 perras del grupo sano y 15 del grupo con piometra. En el caso de estrógenos solamente fue posible realizar las determinaciones en 10 perras del grupo sano y 5 del enfermo.

3.9 BACTERIOLOGIA

Por medio de un bisturí estéril y bajo condiciones de asepsia, al útero extirpado se le realizó un corte en la bifurcación del útero por donde se introdujeron aproximadamente 12 cm de un hisopo estéril de plástico flexible de 15 cm de largo, dirigiéndolo hacia ambas tubas uterinas para coleccionar el contenido uterino rozando al mismo tiempo el endometrio. Este hisopo se introdujo en un medio de transporte Stuart¹ el cual se identificó con el número de la perra y el grupo al que pertenecía. En el laboratorio se transfirió el hisopo a un caldo nutritivo de enriquecimiento (infusión cerebro-corazón)¹ para cultivo bacteriano, incubándose a 37°C por 24 hrs.

El siguiente paso fue utilizar el hisopo para sembrar en Agar MacConkey² por 24 horas a 37° obteniéndose así la purificación bacteriana, continuando con las pruebas bioquímicas específicas para la identificación final de *E coli* (Agar de hierro y triple azúcar: TSI¹, Citrato de Simmons¹, Úrea², Azufre e indol: SIM¹ y Agar de hierro-lisina: LIA¹, las cuales se incubaron a 37°C por 24 hrs. (53, 59).

* Becton Dickinson Vacutainer Systems

1 Bioxon

2 Merck KGaA

Después de haberse tomado la muestra del hisopo, se procedió a obtener una muestra del tejido uterino, de la zona más dañada, la cual se homogenizó y diluyó (1:10 a 1:10,000,000), estas diluciones fueron esparcidas en placas de Agar Mc Conkey e incubadas a 37° C por 24 hrs. Pasado ese tiempo se observó qué placas habían tenido crecimiento bacteriano, el cual fue cuantificado por colonias (Unidades Formadoras de Colonias = UFC) y posteriormente identificadas mediante las pruebas bioquímicas antes mencionadas con el fin de identificar en qué porcentaje de las perras estaba involucrada directamente la *E. coli* en el tejido endometrial.

3.10 CARACTERÍSTICAS DEL ENDOMETRIO.

Una vez tomadas las muestras para los diferentes estudios más adelante mencionados, se procedió a retirar la secreción uterina con agua estéril. Una vez limpio el útero, se anotaron las características que presentaba el endometrio: Tales como aspecto de la mucosa, plegamientos y estructuras irregulares observadas a simple vista (60).

3.11 DETERMINACIONES HORMONALES.

3.11.1 17 β Estradiol (E₂).

La evaluación de E₂ en el plasma sanguíneo, se hizo por el método de radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida descrito por Turzillo (61).

El coeficiente de variación (C.V.) intra ensayo para la dosis de 20pg obtuvo una media de 20.856pg/ml (1.03 con un C.V. de 4.95%) y para la dosis de 1000pg se obtuvo una media de 1166.5pg/ml (4.94 con un C.V. de 0.42%). Teniendo este ensayo una sensibilidad de 10pg/ml.

3.11.2 Progesterona (P₄).

La P₄ fue determinada por medio de RIA fase sólida utilizando el Kit DPC* (*DCP® COAT-A-COUNT® PROGESTERONE) realizada según Srikandakumar (39). El C.V. intra ensayo para P₄ de la dosis de 0.5ng con una media de 0.466ng/ml (0.007 con un C.V. de 1.51%) y a dosis de 20.0ng la media fue de 19.70ng/ml (1.05 con un C.V. de 5.35%). Teniendo este ensayo una sensibilidad de 0.125 ng/ml.

3.12 HISTOLOGÍA

Se tomó una muestra de dos centímetros cúbicos del útero de la zona más afectada, la cual se fijó en formalina al 10% para el estudio histológico, en donde se determinó el grado de lesión que presentaban las hembras con piometra, realizándose la histología según la técnica de Luna (62), utilizada en la sección de histología, del Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M. En dicha técnica se utilizó tinción de Hematoxilina-Eosina como tinción primaria y Gram así como PAS como tinciones secundarias en los casos en donde se observó presencia de bacterias (62, 63).

3.12.1 Clasificación histológica:

Los hallazgos histológicos de la piometra se clasificaron de acuerdo a la extensión de la lesión en los siguientes grados:

Grado I.- Dilatación glandular únicamente.

Grado II.- Hiperplasia del epitelio glandular en un 20% e infiltrado inflamatorio.

Grado III.- Hiperplasia de epitelio glandular, en un 40% e infiltrado inflamatorio.

Grado IV.- Hiperplasia del epitelio glandular en un 60% e infiltrado inflamatorio.

Grado V.- Hiperplasia del epitelio glandular en más de un 60% e infiltrado inflamatorio.

3.13 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Se tomó 1 muestra de 5 mm cuadrados de superficie de tejido uterino de la zona más afectada de cada una de las perras; esta muestra se seccionó a 1 mm de diámetro para posteriormente introducirla en un tubo de ensaye de 10 ml los cuales contenían fijador primario (glutaraldehído + formaldehído al 3%) (64, 65). Una vez en el laboratorio se procedió a realizar la técnica para microscopía electrónica descrita por Hayat (65) en la unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los cálculos se realizaron por medio del programa estadístico ZigmaPlot.

Se determinó el número de perras enfermas con cérvix cerrado y cérvix abierto (estadística no paramétrica).

Se determinó por estadística no paramétrica el porcentaje de presentación de la piometra, según clasificación de Nomura (41).

Se compararon los niveles hormonales séricos de E_2 y P_4 entre perras sanas y con piometra por medio de X^2 cuadrada.

Se comparó el porcentaje de presentación *E. Coli* en perras con piometra contra el grupo de perras sanas (X^2 cuadrada).

Se compararon los hallazgos histológicos del endometrio entre el grupo sano y grupo con piometra (estadística no paramétrica).

Se mencionaron los hallazgos ultraestructurales de las perras con piometra en relación con las sanas.

IV. RESULTADOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.1 Tipo de piometra

La presentación de la piometra según Johnson (49) fue: 5 (33.33%) perras presentaron piometra con cérvix abierto; mientras que 10 (66.66%) presentaron piometra con cérvix cerrado.

Ni las concentraciones circulantes de estrógenos ni las de progesterona fueron significativamente diferentes entre las perras con piometra abierta y aquellas con piometra cerrada (cuadro 3). En ambas hormonas se presentó una marcada variabilidad entre individuos.

Cuadro 3. Relación de la presentación del cérvix (abierto ó cerrado) y los niveles de E₂ y P₄.

	Cérvix abierto (n=5)	Cérvix cerrado (n=10)
Estrógenos (pg/ml)	30.40±9.925	34.0±10.645
Progesterona (ng/ml)	2.11±2.15	8.02±10.64

Los valores son expresados en promedio±desviación estándar. Las diferencias entre grupos no son significativas P> 0.05

La distribución de la secreción uterina se observó unilateral (una sola tuba uterina) en sólo 1 caso (6.66%), y bilateral (ambas tubas uterinas) en 14 casos (93.33%).

Al clasificar a las piometras de acuerdo a su apariencia macroscópica, se encontraron 6 perras (40%) que a pesar de tener piometra tenían un útero de apariencia macroscópica normal; en 5 casos (33.33%) el útero presentó estrangulamientos semejantes a una gestación en su primer

tercio, en 3 casos (20%) se observó un útero pletórico con ausencia de estrangulamientos (figura 1), y un caso (6.66%) de forma mixta: una tuba uterina dilatada sin estrangulamientos y una tuba uterina con apariencia normal.

Figura 1. Útero con piometra bilateral sin estrangulamientos con apariencia de embutido según Nomura (41).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



4.2 Citología vaginal exfoliativa

En la citología vaginal exfoliativa realizada en la etapa del diestro, en perras con piometra se observaron células parabasales e intermedias en más de un 50% del campo, que son los mismos tipos celulares encontrados en las citologías de las perras sanas. En las perras con piometra abierta a diferencia de la cerrada, se observaron además de células intermedias y parabasales algunas células endometriales hiperplásicas, así como neutrófilos y presencia bacteriana.

4.3 Edad de presentación de la piometra

En el cuadro 4 se puede apreciar la edad de presentación de la piometra.

Cuadro 4. Edad de presentación de la piometra

Edad de presentación de la piometra	Nº de casos (n=14)	Porcentaje (100%)
10 meses a 2 años	3	20%
3 a 6 años	7	46.66%
	subtotal n=10	subtotal 66.66%
Mayores a 7 años	5	33.33%

4.4 Bacteriología

En el cuadro 5 se muestra el número de aislamientos de cada bacteria registrados en perras sanas y perras con piometra. La bacteria más comúnmente asociada a los casos de piometra fue la *E. Coli* (86.6%). En contraste, esta bacteria solo estuvo presente en una perra sana (6.6%). La diferencia en la incidencia de *E. Coli* entre perras sanas y perras con piometra es altamente significativa ($P < 0.01$). El resto de las bacterias tuvieron una incidencia similar ($P > 0.05$) en perras sanas y perras con piometra.

Cuadro 5. Aislamientos bacterianos en perras sanas y perras con piometra

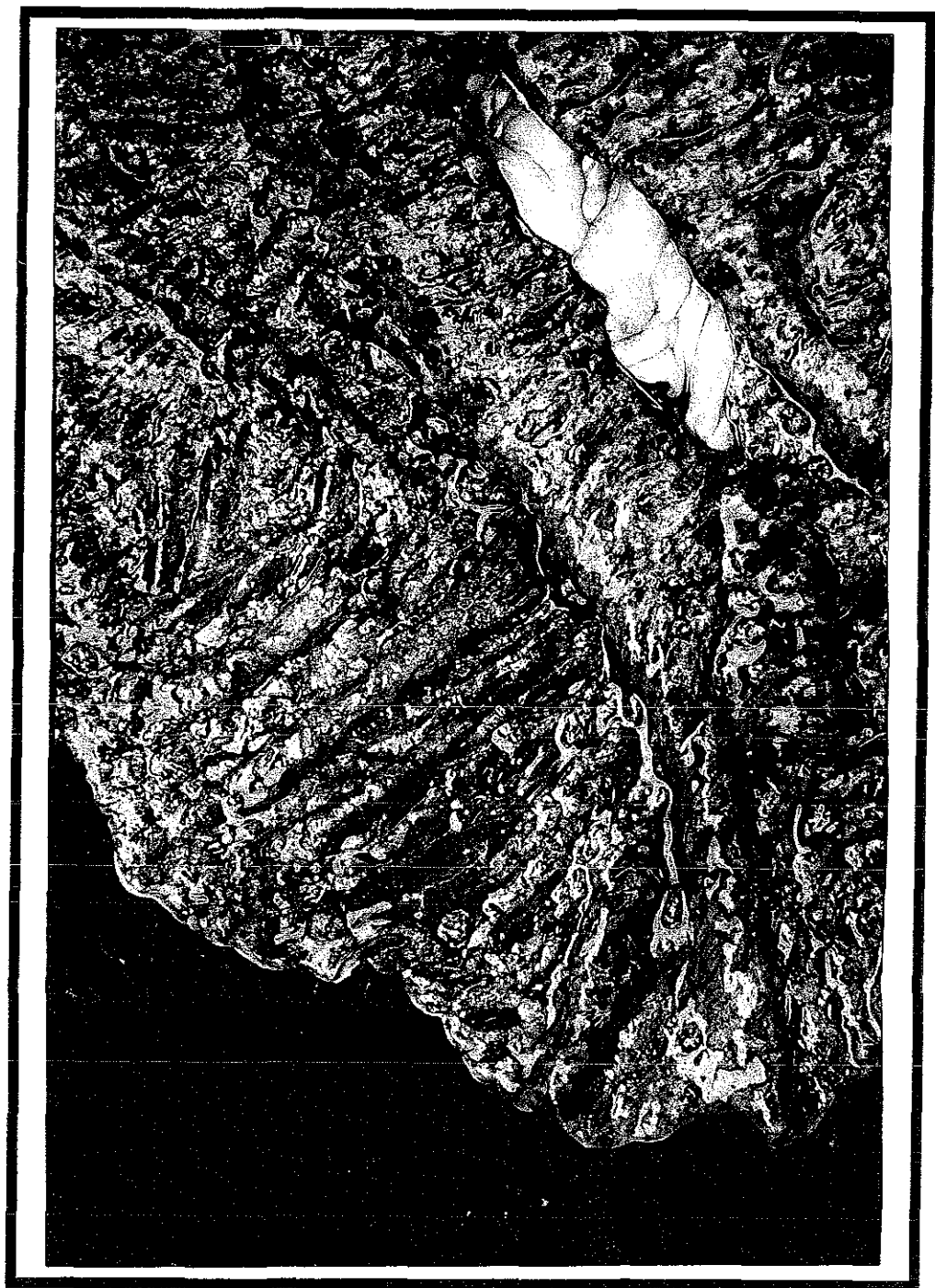
Tipo de aislamiento	Perras sanas		Perras con piometra	
	Nº casos	%	Nº casos	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	66.66	10	66.66
<i>Streptococcus uberis</i>	2	13.33	3	20.00
<i>Streptococcus epidermidis</i>	9	60.00	10	66.66
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	1	6.66		
<i>Streptococcus porcinus</i>	1	6.66		
<i>Streptococcus equisimilis</i>	1	6.66		
<i>Escherichia coli</i>	1	6.66	13	86.66
<i>Aeromona spp</i>	4	26.66	5	33.33
<i>Serratia spp</i>	2	13.33	2	13.33
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	20.00	3	13.33
<i>Klebsiella spp</i>	4	26.66		
<i>Streptococcus canis</i>			1	6.66
<i>Enterobacter aerogenes</i>			1	20.00

4.5 Características macroscópicas del endometrio

La mucosa del endometrio de perras con piometra mostró un engrosamiento severo con plegamientos poco profundos y continuos de aspecto edematoso y presencia de hiperplasia quística endometrial en 11 casos (73.33%) (figura 2); en 2 casos (13.33%), se observó una mucosa lisa, delgada y sin plegamientos y en 2 casos (13.33%), se encontró una mucosa edematosa con algunos puntos de color verde oscuro.



Figura 2. Mucosa engrosada con plegamientos poco profundos y de aspecto edematoso.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.6 Determinaciones hormonales

4.6.1 Progesterona

En el cuadro 6 se presentan las concentraciones individuales de progesterona circulante en cada perra, así como los promedios para cada grupo. Se observó una tendencia a presentar mayores niveles en las perras con piometra; sin embargo, existe una gran variación dentro de cada grupo, por lo que las diferencias entre grupos no son significativas ($P>0.05$).

Cuadro 6. Nivel de Progesterona* en perras sanas y con piometra (ng/ml)

Nº perra	Sanas	Nº perra	Piometra
1	0.59	I	2.22
2	S/M**	II	0.41
3	0.735	III	1.145
4	11.865	IV	0.626
5	1.68	V	7.39
6	9.75	VI	19.58
7	0.015	VII	5.776
8	0.98	VIII	13.39
9	2.07	IX	29.61
10	1.31	X	1.69
11	3.563	XI	1.003
12	0.863	XII	2.235
13	1.073	XIII	0.31
14	1.526	XIV	2.50
15	4.453	XV	2.88
	Media 2.890±3.57		Media 6.051±8.48

*Progesterona sérica expresada en ng/ml. la determinación se realizó por medio de RIA fase sólida con una sensibilidad de 0.125ng y un coeficiente de variación intraensayo de 1.51% Valores expresados como Media ± Desviación Estándar.

**Sin muestra

4.6.2 17 B Estradiol (E2)

Las concentraciones plasmáticas de estradiol en perras con piometra fueron significativamente menores ($P < 0.01$) a las de perras sanas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Nivel de Estrógenos (E) en perras sanas y con piometra (pg/ml)

Nº perra	Sanas	Nº perra	Piometra
1	S/M**	I	19.70
2	S/M**	II	S/M**
3	117	III	57.95
4	70.80	IV	S/M**
5	66.40	V	S/M**
6	87.69	VI	S/M**
7	76.300	VII	13.55
8	S/M**	VIII	S/M**
9	60.80	IX	21.05
10	45.40	X	S/M**
11	S/M**	XI	S/M**
12	101.10	XII	S/M**
13	95.75	XIII	S/M**
14	77.650	XIV	46.95
15	S/M**	XV	S/M**
	Media 79.91 ± 21.06		Media 31.84 ± 19.41

*Estrógenos séricos expresada en pg/ml, la determinación se realizó por medio de RIA fase sólida con una sensibilidad de 10pg y un coeficiente de variación intraensayo de 4.95%. Valores expresados como Media ± Desviación Estándar Utilizándose el programa estadístico SigmaPlot

**Sin muestra

4.7 Histología

Perras sanas

Los resultados histológicos de las perras sanas no mostraron material inflamatorio, las glándulas uterinas presentaban un epitelio cúbico simple intercalado de algunas células caliciformes, éstas contenían material mucinoso de apariencia normal. La relación glándulas: intersticio fue de 2:1, lo cual se considera como normal (Figura 3). Sólo las perras 7 y 9 presentaron hiperplasia tipo I; y de éstas la perra 9 tuvo presencia de células plasmáticas y polimorfo nucleares con vasculitis, inflamación y acúmulo de colesterol. Estas dos perras demostraron como los diagnósticos no siempre son acertados y que aunque en las pruebas de gabinete se informaron como sanas, la hiperplasia ya estaba presente.

En la perra sana en donde se encontró la presencia de *E. Coli* en exudado, se encontró una hiperplasia tipo I sin infiltrado celular inflamatorio.

Perras con piometra

Las perras con piometra presentaron cambios aparentes a nivel glandular, observándose dilatación glandular e hiperplasia epitelial en 4 casos (cuadro 8), así como glándulas hiperplásicas en donde se perdió la luz glandular. En 4 casos se observaron glándulas dilatadas, lo que se conoce en medicina humana como forma de orejas de ratón, características de tejido hiperplásico. La relación glándulas: intersticio se observó 1:2 a favor del intersticio (Figura 4), lo cual es considerado anormal. En 12 casos estuvieron presentes las células plasmáticas; en 6 hubo presencia de un infiltrado de tipo polimorfo nuclear, poco más de la mitad (7 casos) presentaron la presencia de piocitos. Los linfocitos únicamente se observaron en 2 casos y en un sólo caso se encontró la presencia de macrófagos. Tres casos presentaron necrosis tanto en epitelio endometrial como en endometrio.

Dependiendo del grado de hiperplasia encontrado, la piometra se clasificó en 5 tipos (del I al V, ver cuadro 8), según el grado de lesión observada y descrita en material y métodos. El 6.66% (1 caso de 15) de las hembras se encontró con piometra tipo I. El 20% (3 casos de 15) se observó con piometra tipo II. El 33.33% (5/15) con tipo III, mientras que el 33.33% (5 casos de 15) tipo IV y el 6.66% (1 caso de 15) se observó tipo V.

En el caso de las hiperplasias IV y V se llegó a observar la presencia de flora bacteriana encontrándose tanto cocos gram negativos como positivos (Cuadro 8).

En las histologías en donde fue aislada la *E. coli* de tejido uterino, los grados de hiperplasia de acuerdo a la clasificación descrita en material y métodos fueron:

En 1 caso se observó hiperplasia de grado I, en donde no había presencia de células plasmáticas, ni piocitos, ni polimorfos (Figura 5), pero presentaba en el ovario izquierdo 3 quistes foliculares. Lo anterior ayudo a relacionar principalmente a las glándulas dilatadas y quistes foliculares (hallazgos localizados sólo en estos casos) y secundariamente a los piocitos con la presencia de *E. coli* en tejido.

En 2 casos con grado de hiperplasia III, en donde se observó dilatación glandular, células plasmáticas y piocitos, además de vasculitis, congestión e hiperplasia quística (Figura 6). En una perra se observó un quiste folicular muy grande, en el ovario izquierdo y en la otra perra 2 quistes foliculares en el ovario derecho.

Y en 1 caso de tipo V de hiperplasia, en donde se encontraron glándulas dilatadas, células plasmáticas y piocitos; además de abundante flora cocoide (Figura 7).

CUADRO 8. TIPOS DE HIPERPLASIA GLANDULAR EN PERRAS CON PIOMETRA SEGÚN LA CLASIFICACION DEL APARTADO 3.14.1

TIPO DE HIPERPLASIA	CASOS DIAGNOSTICADOS	TOTAL DE CASOS Y SU %
I	Perra: X	1 (6.66%)
II	Perras: VIII, XIV y XV	3 (20.00%)
III	Perras: II, V, XI, XII y XIII	5 (33.33%)
IV	Perras: I, III, IV, VII y IX	5 (33.33%)
V	Perra: VI,	1 (6.66%)

Grado I. - Dilatación glandular únicamente

Grado II. - Hiperplasia del epitelio glandular en un 20% e infiltrado inflamatorio.

Grado III. - Hiperplasia de epitelio glandular en un 40% e infiltrado inflamatorio.

Grado IV. - Hiperplasia del epitelio glandular en un 60% e infiltrado inflamatorio.

Grado V. - Hiperplasia del epitelio glandular en más de un 60% e infiltrado inflamatorio.

FIGURA 3. Endometrio sano en donde se observa la apariencia normal de las glándulas y su relación 2:1, en donde se observan glándulas tubulares (GT) o redondas (G). Obsérvese el endometrio sin cambios aparentes (E).10X

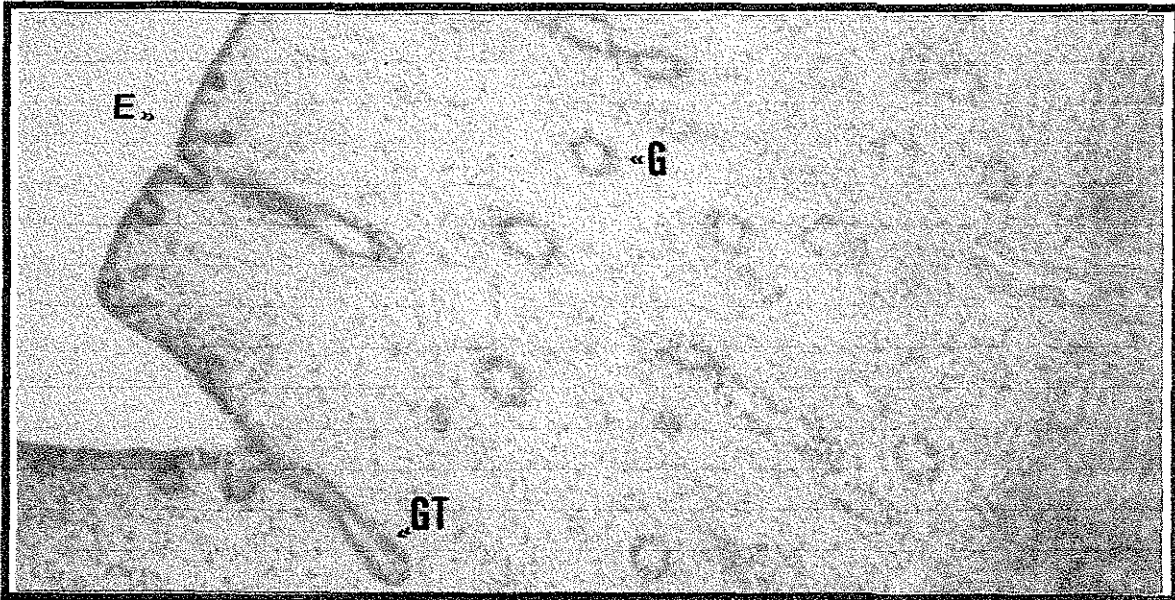
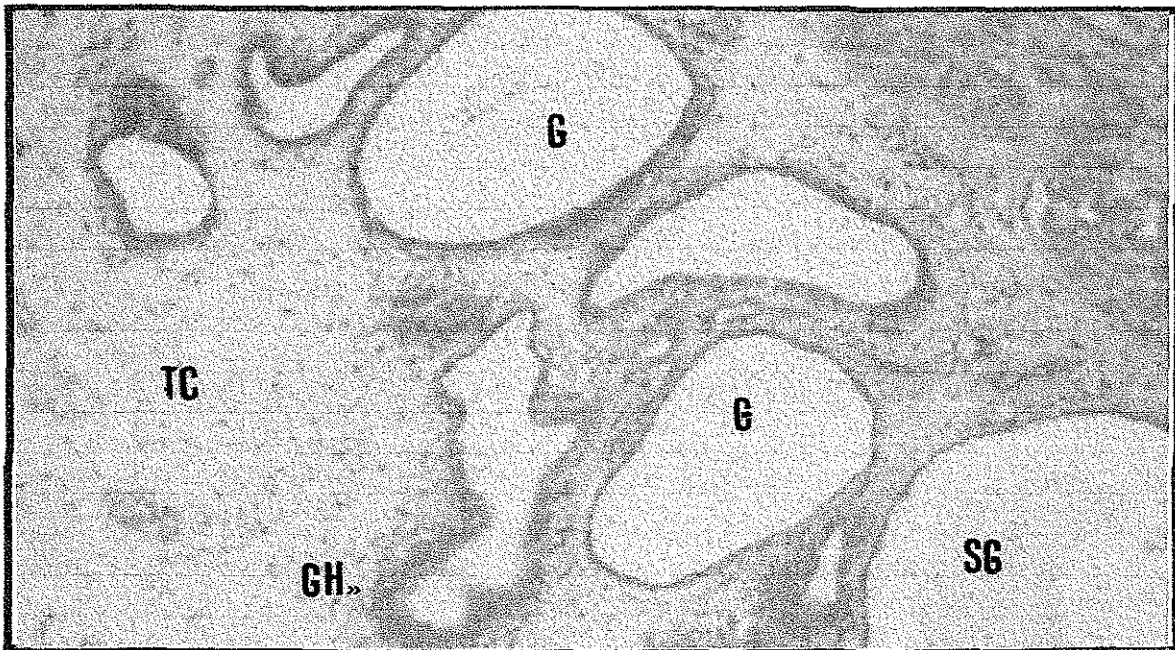


FIGURA 4. Endometrio con piometra en donde se observan la relación 1:2 de las glándulas e intersticio, donde se observan glándulas endometriales dilatadas (G); algunas hiperplásicas (GH), tejido conectivo (TC) y secreción glandular (SG).10X



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 5. Endometrio de perra con piometra tipo I, en donde se observan las glándulas endometriales dilatadas (G), la hiperplasia es poco aparente. 30X

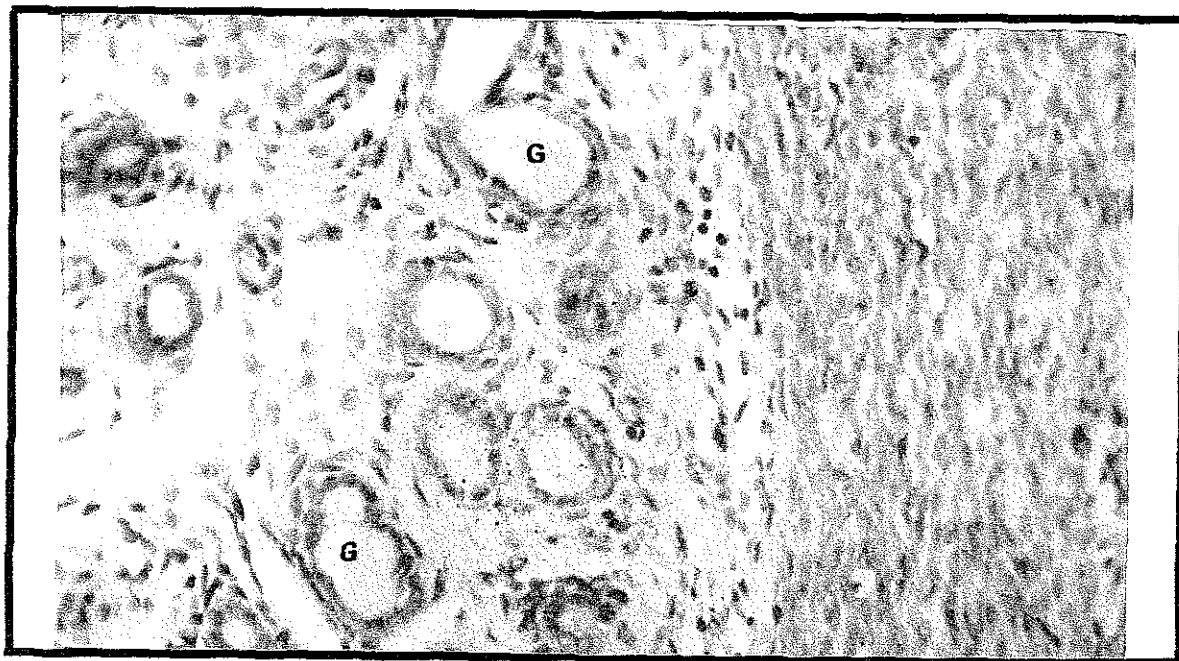


FIGURA 6. Endometrio de perra con piometra tipo III, en donde se observan las glándulas endometriales dilatadas (G). Obsérvese el grado de hiperplasia menor que la figura 7.10X



FIGURA 7. Endometrio de perra con piometra tipo V, en donde se observan las glándulas endometriales hiperplásicas (G) y abundante flora cocoide (★).30X



4.8 Microscopía electrónica de transmisión

Al observarse en el microscopio óptico los cortes semifinos del endometrio uterino de perras sanas, se encontró histológicamente normal sin cambios aparentes; sin embargo en las perras con piometra, esta vista panorámica mostró hiperplasia leve además de glándulas de forma irregular.

En el microscopio electrónico de transmisión se observó que en el endometrio de perras sanas, el epitelio es cúbico simple con núcleo indentado o lobulado con una eucromatina finamente dispersa y una escasa heterocromatina perinuclear. Se encontraron algunos nucleolos prominentes (figura 8).

En la figura 9, en la glándula de perra con piometra se observó una hiperplasia marcada, en el citoplasma de las células fue posible ver gran cantidad de vacuolas en el retículo endoplasmico rugoso observándose en su interior material de secreción.

En hembras sanas los núcleos de las células glandulares del endometrio presentan forma nuclear indentada y en el citoplasma de la célula se puede observar mitocondrias de apariencia normal, así como presencia de lisosomas (Figura 10), La cromatina en el núcleo se encuentra distribuida de manera regular la cual se encuentra poco condensada a la periferia (figura 12).

En hembras con piometra las células glandulares se encontraron pleomórficas con núcleos de redondos a indentados con nucleolos prominentes (figura 11) y la heterocromatina perinuclear con cambios en la membrana nuclear llegándose a observar proyecciones formadas por ribosomas (figura 13).

En un acercamiento de las microvellosidades del endometrio de perra con piometra, se puede apreciar el crecimiento de las microvellosidades fuera de lo común, lo mismo que su distribución en el epitelio, la unión intercelular presenta una *zonula adherens* bien delimitada y con mayor número de interdigitaciones (figura 14), el crecimiento o hiperplasia de las microvellosidades puede ser tan severo que en ocasiones presenta ramificaciones parecidas a estereocilios (figura 15).

Al observar el acercamiento de la unión entre dos células epiteliales de una glándula de perra sana (figura 16) se pudo observar la *zonula adherens* continua con grosor uniforme, desmosomas con escasos filamentos intermedios. En el citoplasma hay mitocondrias con crestas mitocondriales no hinchadas, lisosomas escasos, vacuolas, ribosomas libres. En la luz del epitelio se observa microvellosidades en corte transversal y longitudinal (figura 16).

En el acercamiento de la unión entre dos células epiteliales de glándula de perra con piometra, se observa una discontinuidad en la *zonula adherens*; los desmosomas muestran un incremento en la longitud de los filamentos intermedios; hay escasas mitocondrias así como lisosomas; las microvellosidades se observan escasas en cortes transversales y longitudinales (figura 17).

En las hembras sanas las células mioepiteliales se observan de forma fusiforme y el núcleo presenta eucromatina dispersa, escasa heterocromatina perinuclear. El citoplasma de las

células presenta escasas vesículas pinocíticas; las uniones intercelulares con espacio uniforme y desmosomas con escasos filamentos (figura 18).

En las perras con piometra, en las células del miometrio se observó un núcleo con escasa eucromatina dispersa y con una mayor cantidad de heterocromatina perinuclear. En el citoplasma no hay evidencia de lisosomas, se observó en el espacio intercelular numerosas vacuolas pinocíticas y un mayor espacio en las uniones intercelulares, así como presencia de numerosos desmosomas (figura 19).

En las en el citoplasma de las células mioepiteliales de la perra sana se observan los tonofilamentos con distribución uniforme (figura 20); Observándose lo contrario en las perras con piometra, ya que muestran en el citoplasma filamentos intermedios de agrupación concéntrica y no son evidentes los cuerpos electrodensos (figura 21).

En el endometrio de una perra sana se observó un endotelio no fenestrado, los núcleos de las células endoteliales son fusiformes con abundante heterocromatina, eucromatina dispersa, numerosos eritrocitos en la luz. Este endotelio se observó delgado y con ausencia de vacuolas intracitoplásmicas (figura 22).

En el endometrio de una perra con piometra se encontró un endotelio con fenestraciones y numerosas vesículas pinocíticas. El endotelio mostró un aumento en el grosor del endotelio, así como presencia de fenestraciones citoplasmáticas (figura 23).

Por último en las perras con piometra se observó un aumento en el número de apoptosis (muerte celular programada (66)) lo cual en estas perras fue muy evidente, sobre todo en aquellos casos en los que la *E coli* estaba presente tanto en contenido uterino, como en tejido uterino (figura 24).

FIGURA 8. Glándula endometrial de perra **sana** (G) en diestro, la cual no presenta secreción lo que permite al núcleo (N) permanecer en la parte media celular. En el epitelio glandular se observan las microvellosidades (Mv) distribuidas de manera regular y tamaño uniforme. 3,000X

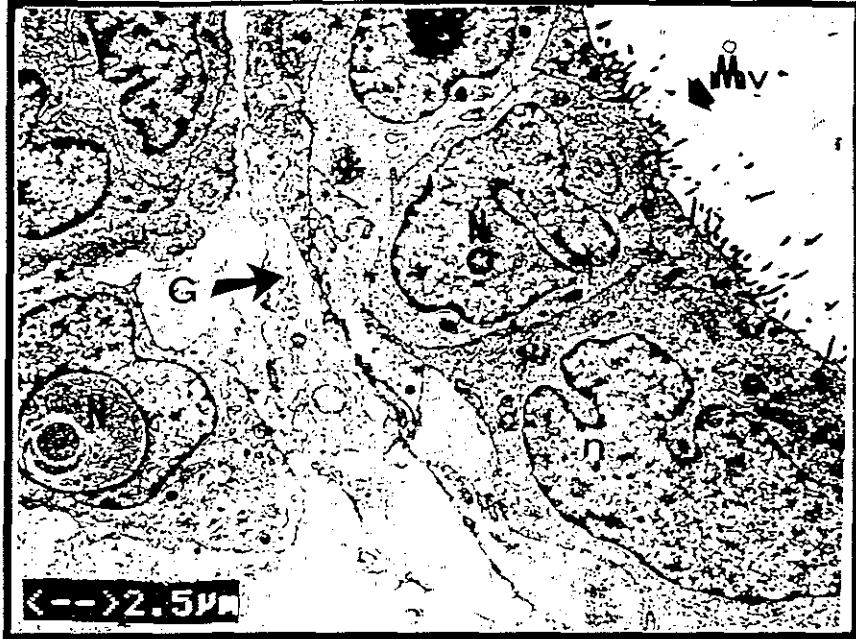
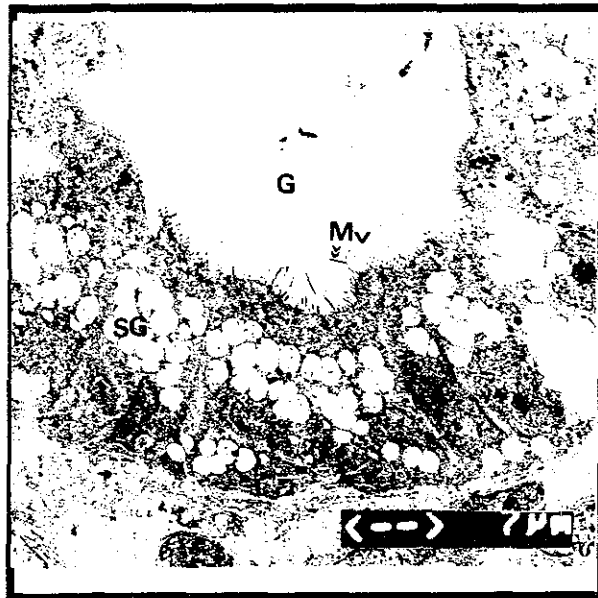


FIGURA 9. Glándula endometrial de perra con **piometra** (G) en diestro que presenta abundante secreción (SG) la cual desplaza al núcleo a la parte basal de la célula, en el epitelio glandular se observan las microvellosidades (Mv) aumentadas de tamaño de manera irregular. 1,100X



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 10. Acercamiento de una célula glandular endometrial de perra **sana**, se observa su núcleo (N) indentado con heterocromatina a la periferia, mitocondrias (Mi) con apariencia normal; no se observa presencia de secreción y en la luz de las glándulas se observan las microvellosidades (Mv) distribuidas uniformemente y de tamaño regular. 12,000X



FIGURA 11. Acercamiento de una célula de glándula endometrial de perra con **piometra**, se observa su núcleo (N) redondo con presencia muy aparente del nucleolo (Nu), las mitocondrias hinchadas (Mi) observándose aumentado su número, secreción aumentada (Sg), y se puede apreciar en la luz glandular (L) en dónde se observa la ausencia e irregularidad de microvellosidades (Mv). 3,000X



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 12. Acercamiento de una célula glandular endometrial de perra **sana** con núcleo (N) indentado y no presenta proyecciones; se observa la heterocromatina (He) en la periferia. Obsérvese las microvellosidades (Mv) uniformes en comparación con la figura 3. 12,000X

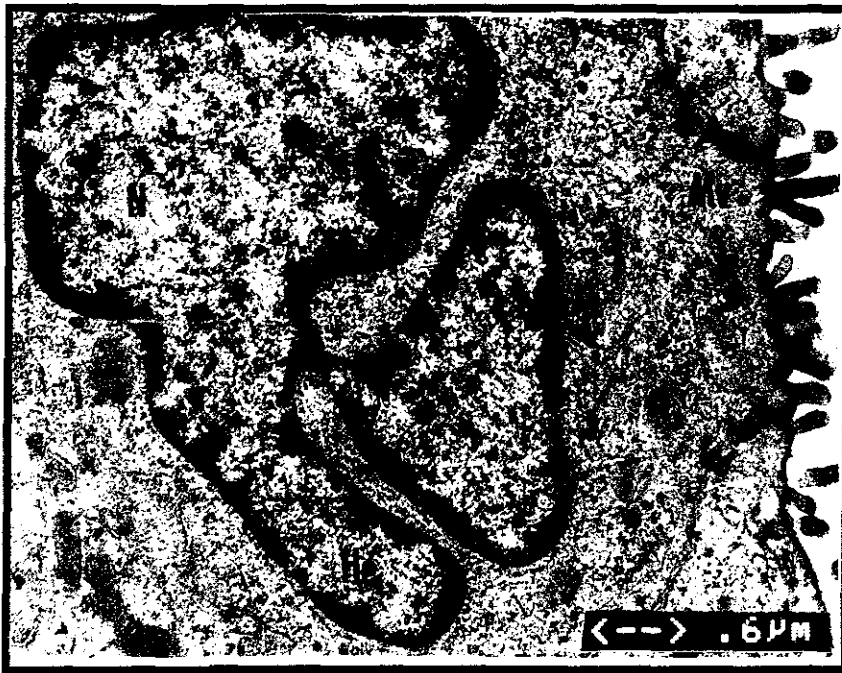
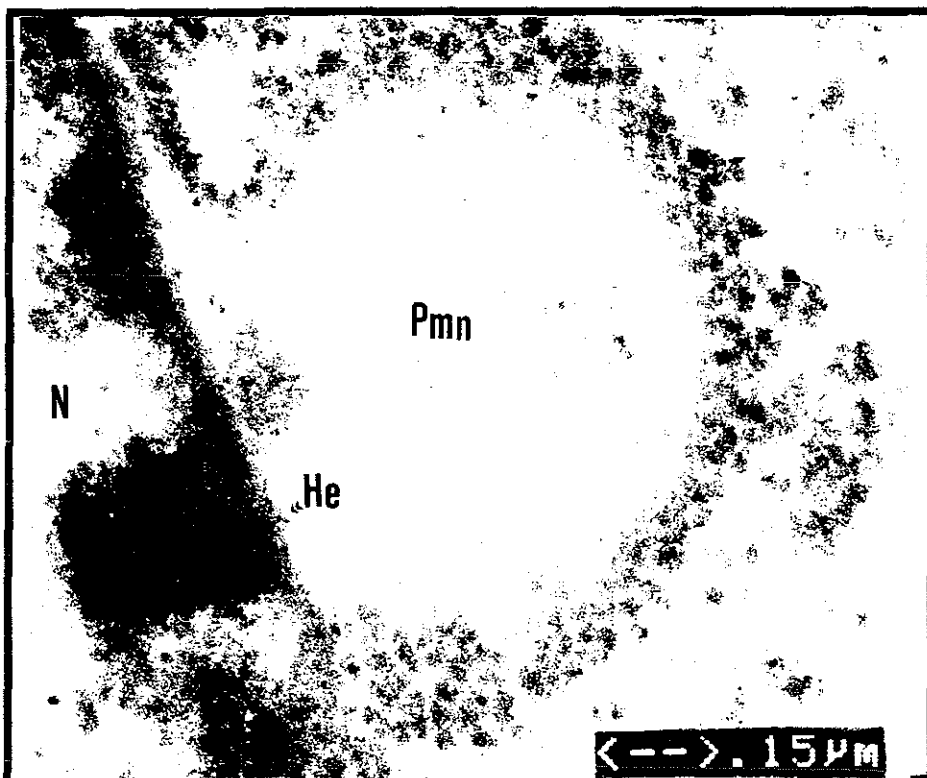


FIGURA 13. Acercamiento del núcleo (N) de una célula glandular endometrial de perra con piometra en donde se aprecia la proyección de la membrana nuclear (Pmn), indicando esta proyección una actividad nuclear aparente. La heterocromatina se aprecia más electrodensa a la periferia del núcleo (He). 30,000X



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 14. Acercamiento de microvellosidades de una célula glandular endometrial de una perra con piometra observándose la forma aumentada irregular en las microvellosidades (Mia); *zonula adherens* bien delimitada (Za) 30,000X



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 15. Cuando se encontró la piometra en grados IV y V se observaron severos cambios en las microvellosidades con engrosamiento y ramificación parecidas a estéreocilios (Mv). 50,000X

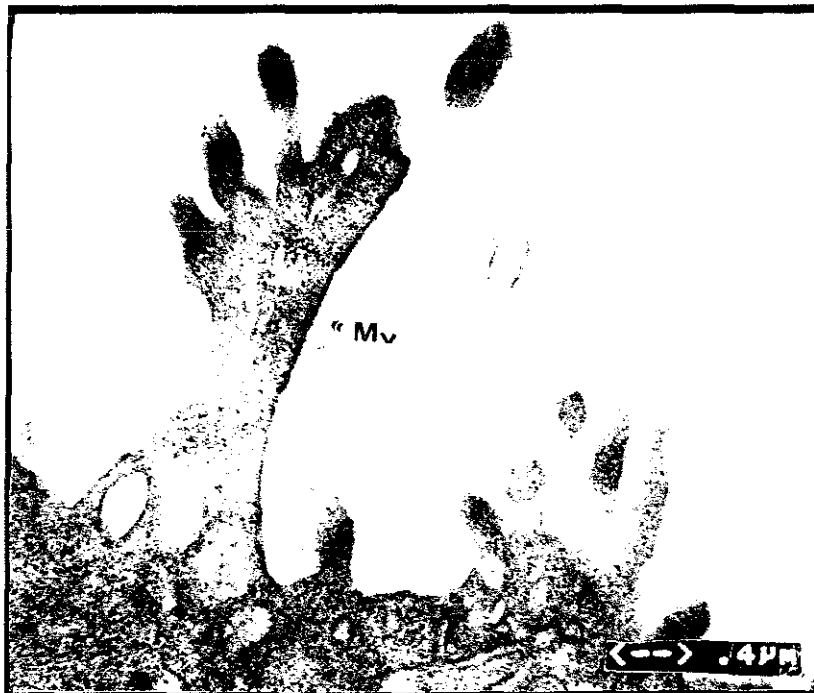


FIGURA 16. Acercamiento de la unión entre dos células epiteliales de una glándula de perra sana, se observan cortes transversales y longitudinales de las microvellosidades (Mv), *zonula adherens* continua con grosor uniforme, desmosomas (Ds) con escasos filamentos intermedios (F). En el citoplasma hay mitocondrias con crestas mitocondriales no hinchadas (Mi), presencia de lisosomas (Li), ribosomas libres (r). En la luz (L) del epitelio microvellosidades en corte transversal y longitudinal (Mv). 12,000X

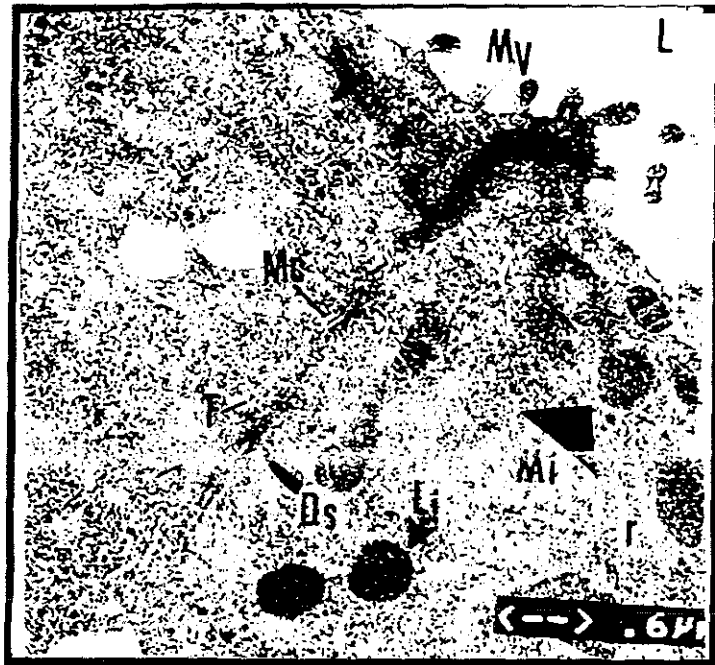


FIGURA 17. Acercamiento de la unión entre dos células epiteliales de glándula de perra con piometra. En la parte apical (L) se observan cortes transversales y longitudinales de las microvellosidades (Mv), se observó una discontinuidad en la *zonula adherens*; los desmosomas (Ds) se encuentran condensados con un incremento en los filamentos intermedios (F), lisosomas libres. 12,000X

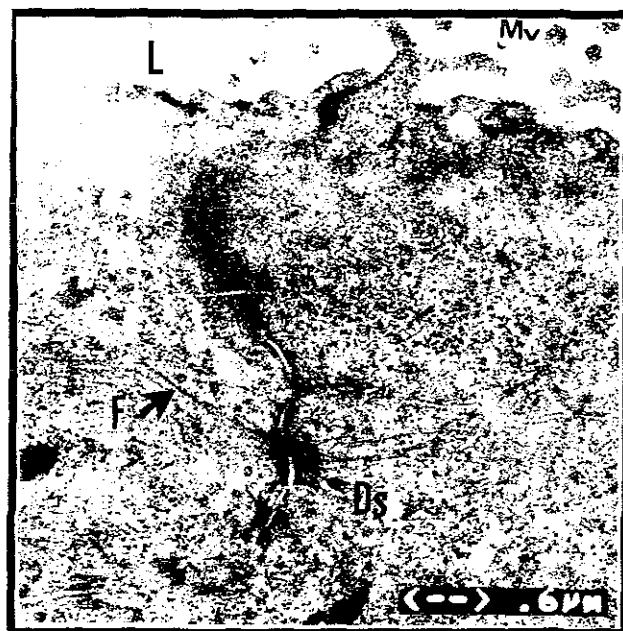


FIGURA 18. Miometrio de perra sana en donde se observa en la membrana citoplásmica (Mc) del fibroblasto, observe la poca cantidad de vesículas pinocíticas (Vp), desmosomas poco electrodensos (Ds), heterocromatina con distribución uniforme en los núcleos, la cual se observa poco condensada a la periferia (He). 20,000X

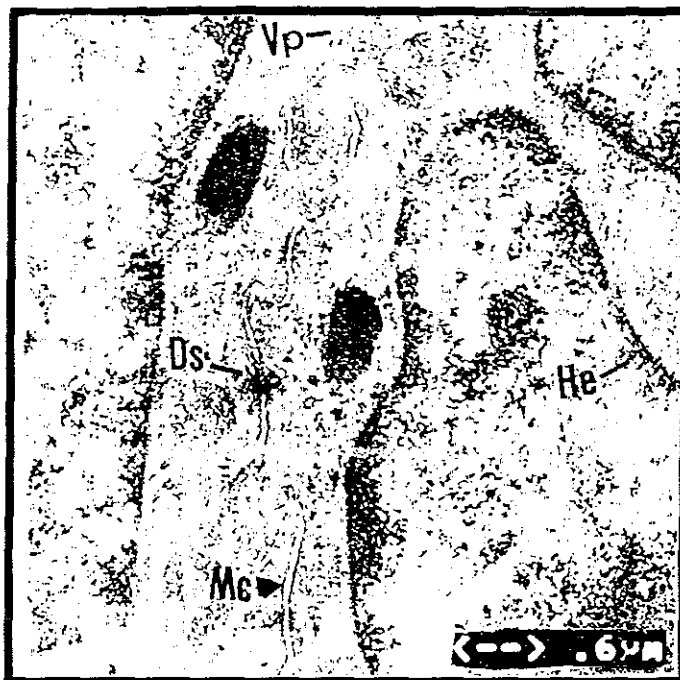
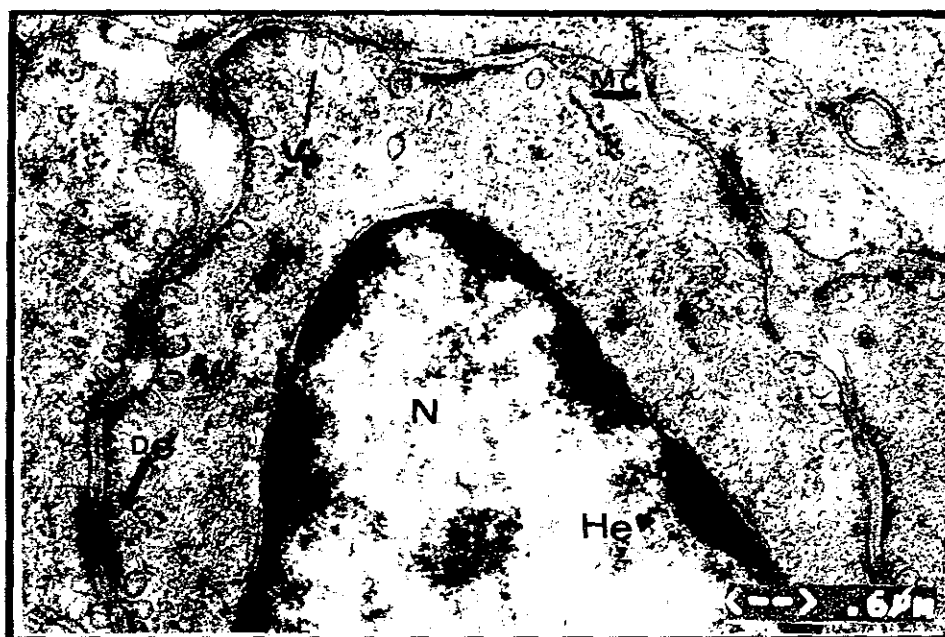


FIGURA 19. Miometrio de perra con piometra en donde se observa en la membrana citoplásmica (Mc) del fibroblasto gran cantidad de vesículas pinocíticas (Vp), desmosomas muy aparentes (Ds), heterocromatina a la periferia (He); este hallazgo indica una comunicación activa entre las células del miometrio. 20,000X

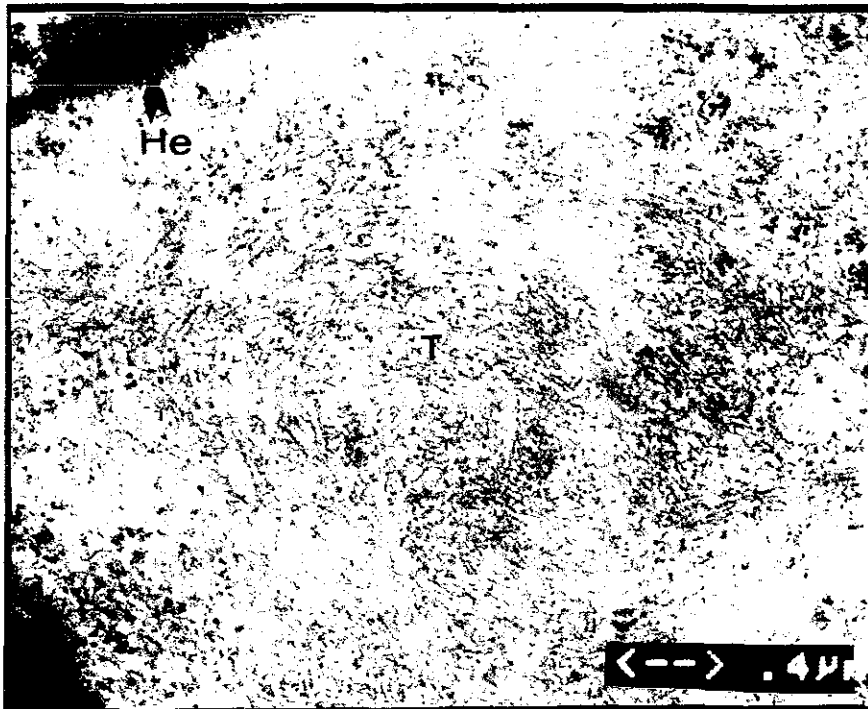


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 20. Acercamiento de una célula mioepitelial de una perra sana en donde se aprecia el acomodo uniforme de los tonofilamentos (T) y la heterocromatina distribuida uniformemente apenas más condensada en la periferia nuclear (He) 20,000X



FIGURA 21. Acercamiento de una célula mioepitelial de una perra con piometra en donde se aprecia la forma desordenada de los tonofilamentos (T). Heterocromatina más concentrada en la periferia (He). 20,000X



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 22. Endotelio vascular del endometrio de una perra sana (E), observe la luz endotelial (L), la células del endotelio no presentan aumento en su grosor ni proyecciones citoplásmicas. Se aprecian eritrocitos en la luz (e), núcleos con hendiduras y heterocromatina a la periferia (N); en ésta foto no es evidente la presencia de mitocondrias, heterocromatina con distribución normal y ausencia de vacuolas intracitoplásmicas, 12,000X

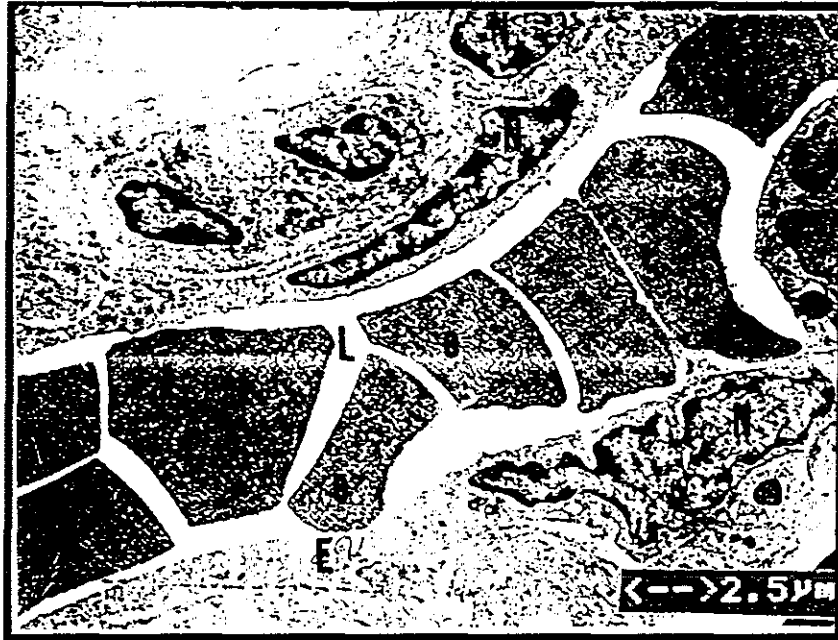
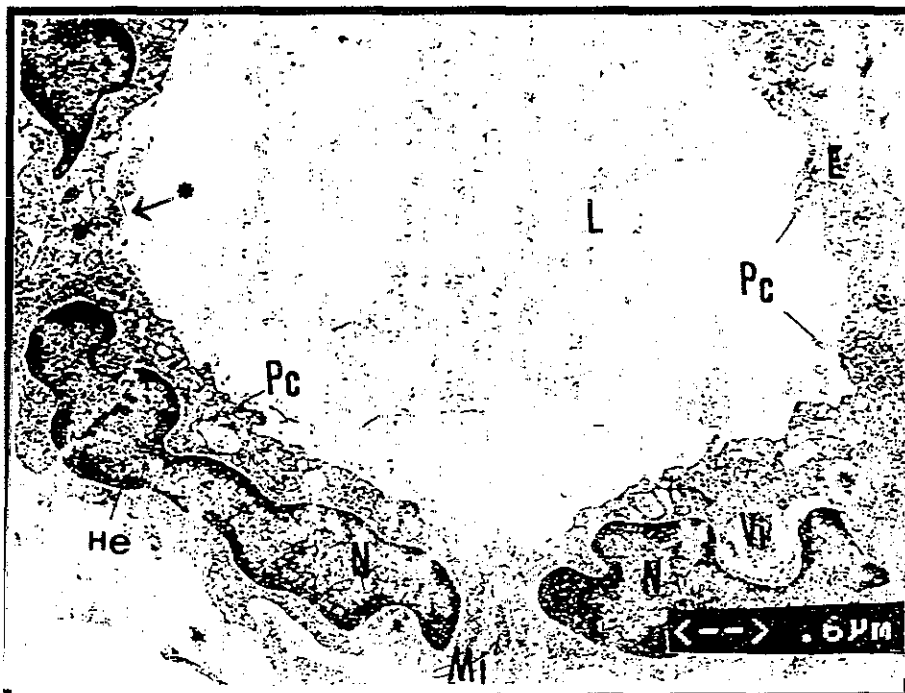
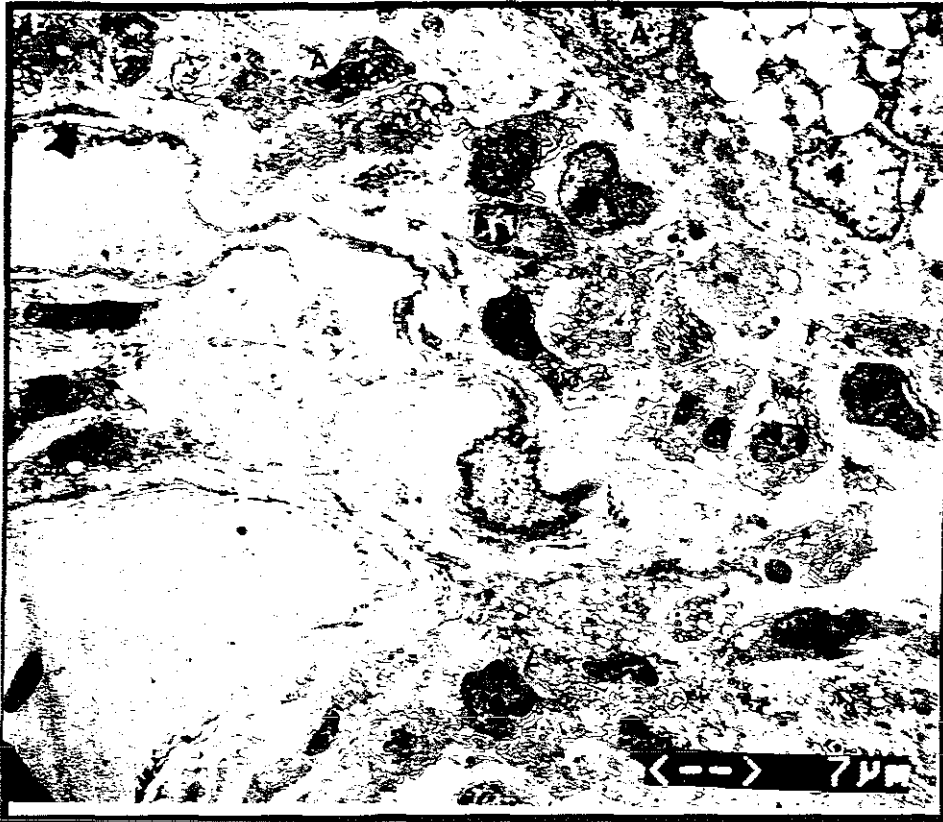


FIGURA 23. Endotelio vascular del endometrio de una perra con piometra (E). Se aprecia la luz endotelial (L), las células del endotelio presentan un aumento en su tamaño con proyecciones citoplásmicas (Pc) hacia la luz, núcleos con hendiduras (N), Mitocondrias hinchadas (Mi) y heterocromatina a la periferia (He) así como gran cantidad de vacuolas intracitoplásmicas (Vi). 12,000X



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FIGURA 24. En el caso de las perras con piometra se presentó un aumento en el número de apoptosis (A) en las células, la cual se ve acompañada con presencia de *E coli* (la cual no se aprecia en esta figura).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

La piometra en perras se caracteriza por presentarse en la etapa de diestro, por lo tanto era importante verificar ésta etapa tanto en perras sanas como en enfermas, lo que se hizo por medio de citología vaginal exfoliativa. El diestro en perras sanas se caracteriza por un retorno en la presentación mayoritariamente de células parabasales, con un mínimo número de células superficiales y muy pocos neutrófilos. En los casos de piometra cerrada el cuadro fue semejante, mientras que en el caso de perras con piometra abierta, se incrementó el número de neutrófilos y se encontraron además células endometriales hiperplásicas. Todo esto concuerda con lo descrito por Olson et al. (17 y 50).

En los años previos a la utilización de hormonas sintéticas para modificar el ciclo estral o para ocasionar el aborto, se observaba la piometra únicamente en hembras adultas de más de 6 años (ver cuadro 4) según lo informado por Bowen et al. (42), Nomura (7) y Nelson and Feldman (21), atribuyéndose este hecho principalmente a una degeneración del útero a medida que transcurrían ciclos estrales sin gestación, ya que la hiperplasia quística endometrial que precede a la piometra se presenta por la exposición a la progesterona durante los 2 meses que dura el período de diestro, que en el caso de la perra es mucho más prolongado que en otras especies. Sin embargo, en el presente estudio se puede apreciar (cuadro 3) que el 66.66% (10 casos) de perras que presentaron piometra fueron hembras menores de 6 años de edad. Al cuestionarse porque la diferencia de edades registradas en este estudio, se revisó la historia clínica de las hembras, encontrando que en 2 casos, las perras diagnosticadas con piometra presentaron la enfermedad luego de haberseles inducido a una de 6 años el aborto y a la otra de 2 años el estro

con acetato de melengestrol vía oral. Esto concuerda con lo ya descrito por Koowatanatawan (31), el cual informó sobre la disminución en la edad a la que se presentaba la piometra en fechas más recientes y que atribuyó al uso indiscriminado de hormonas utilizadas para poner fin a una gestación o para inducir el estro, habiendo también detectado que los productos más utilizados fueron las combinaciones de progesterona y estrógenos (acetato de melengestrol, acetato de medroxiprogesterona y proligestona). Esta misma observación fue hecha por Bowen et al. (42) en cuanto a la aplicación de estrógenos únicamente (diétilstilbestrol y cipionato de estradiol).

Existe también información respecto a la diferencia de conformación del útero con piometra, ya que Nomura encontró que la apariencia macroscópica del útero con piometra era similar a la de un útero gestante en diferentes tercios de la gestación, dependiendo esto del grado de hiperplasia presente en los úteros con piometra (41, 44). Considerando que las concentraciones hormonales tanto de estrógenos como de progesterona son aparentemente iguales en diestro, gestación y piometra, y que estas hormonas se distribuyen en forma sistémica por todo el organismo (6, 7), su efecto debería ser igual en ambas tubas uterinas. Sin embargo, la presencia de piometra puede desarrollarse en forma parcial o unilateral, no resultando simétricas como en el caso de la gestación (41). Lo que se observó en el presente estudio (ver cuadro 4) fue un 93.33% (14 casos) con presentación bilateral; y sólo un 6.66% (1 caso) con presentación unilateral. Una de las posibilidades que se investigó fue que existiera algún tipo de taponamiento en la tuba uterina no afectada en éste último caso, por lo que se introdujo en ambas tubas el hisopo con el que se tomó la muestra de contenido uterino; el hisopo entro sin dificultad en ambas tubas, comprobándose que había relación entre el útero y ambas tubas uterinas. Por lo tanto no se pudo comprobar el porque de la unilateralidad de este caso.

En este trabajo, la perra número VI y la perra número IX incluidas en el protocolo de estudio correspondieron a perras en donde los dueños ignoraban la presencia de piometra, en ambos casos se encontró el cérvix cerrado, debido a lo cual no se observaron secreciones vulvares; sus concentraciones de progesterona se encontraron de 19.58 y 29.61 ng/ml respectivamente. La enfermedad fue diagnosticada al observarse la signología característica de esta patología (abultamiento de abdomen, depresión, polidipsia y poliuria). Al confirmarse el diagnóstico se procedió a retirar quirúrgicamente el útero.

Otro punto que interesaba aclarar era porque algunas perras presentaron piometra con cérvix abierto (33.34% = 5 casos) y otras piometra con cérvix cerrado (66.66% = 10 casos), si todas las perras estaban en diestro y por lo tanto bajo la influencia de progesterona, la cual actúa normalmente provocando el cierre del cérvix (7,9). Sin embargo en esta misma etapa hay presencia de estrógenos, que tienen la función de relajar el cérvix (42). Por esta razón se compararon los niveles de estrógenos y progesterona en los animales enfermos, para tratar de entender que tipo de relación existía entre ambas hormonas para producir este signo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de progesterona o estrógenos entre perras con cérvix abierto y aquellas con cérvix cerrado (cuadro 3).

En cuanto al nivel sérico de estrógenos, las investigaciones realizadas por varios autores (18, 21, 29, 35, 37) mencionan que la presencia continua de esta hormona, puede desencadenar la disfunción uterina, mientras que otros autores piensan que una hiperactividad en la pituitaria es la causa del exceso en la producción de estrógenos en el ovario, y del exceso en la producción de progesterona por parte del cuerpo lúteo (10).

Sin embargo, en el presente estudio las perras enfermas, sin importar si el cérvix estaba abierto o cerrado, generalmente presentaron menores niveles séricos de estrógenos (ver cuadro 7) (31.84 ± 19.41 pg/ml) que las sanas (79.91 ± 21.06 pg/ml), encontrando una diferencia estadística entre ambos grupos ($P < 0.01$). Las bajas concentraciones de estrógenos durante el diestro pueden favorecer una reducida síntesis de receptores endometriales para progesterona, ya que según la literatura, la presencia de estrógenos durante el diestro contribuye a la síntesis de receptores intracelulares de progesterona disponibles (20).

En un estudio histoquímico se investigó el útero de perras, sugiriendo que la presencia continua de niveles elevados de estrógenos puede contribuir a la presentación de la piometra, sugiriendo que el cambio en el número y afinidad de sitios para receptores hormonales endometriales produce acumulaciones anormales de estas hormonas (P_4 y E_2) ocasionando cambios histológicos como el aumento en la actividad secretora de las glándulas endometriales (10).

Los niveles hormonales de P_4 (ver cuadro 6) en hembras con piometra (6.051 ± 8.48 ng/ml) se encontraron ligeramente elevados en comparación con hembras sanas (2.890 ± 3.57 ng/ml). Sin embargo las diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$) y al igual que en los estrógenos la variabilidad individual fue muy grande, lo que puede deberse al patrón pulsátil de secreción de estas hormonas, ya que el momento de la toma de la muestra puede corresponder a un pico o a un valle. Esto concuerda con Nomura (22) que observó en concentraciones séricas de P_4 que variaban desde 3.00 a 95.00 ng/ml con un promedio de 18.95 ± 17.04 ng/ml, y con Chaffaux y Thibier (6), quienes en un estudio de 35 perras obtuvieron concentraciones desde 0.45 hasta

13ng/ml; en cuyos estudios no se encontró diferencia estadística significativa en el nivel sérico de P₄, entre el grupo de piometra y el grupo sano.

En lo que se refiere a la flora bacteriana encontrada en el útero, se sabe que en la vagina todo el tiempo se encuentra flora bacteriana que bajo condiciones normales no es patógena. Esta flora puede alcanzar el útero desde la vagina en el momento del coito debido a la relajación que sufre el cérvix en el estro por acción de los estrógenos, contaminándose en forma ascendente. También puede ser introducida al momento de la inseminación artificial, o durante el parto, e inclusive es posible que en determinadas circunstancias lleguen por medio de la circulación (5, 7, 21). Sin embargo, en investigaciones hechas por Borresen (4) y Dow (8) se menciona que al momento de realizar aislamientos bacteriológicos en úteros de perras con piometra, el resultado de las pruebas mostró un contenido estéril. Sin embargo, dichos investigadores no precisan en sus resultados si estas perras una vez diagnosticadas con la enfermedad fueron o no medicadas, razón por la cual el aislamiento pudo ser negativo.

Con relación a las bacterias aisladas en contenido uterino, en el presente estudio (cuadro 5), si se exceptua a la *E. coli* se encontró similitud en los aislamientos bacterianos realizados del contenido uterino tanto de perras sanas como de perras enfermas, encontrando la presencia de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Aeromona*, *Citrobacter*, *Serratia* y *Klebsiella*. Coincidiendo con los resultados obtenidos por autores como Borresen (4), Sandholm et al (5), Nomura, K. (22), Nomura, K. (67) y Fayrer-Hosken et al. (68).

Sin embargo, es muy importante hacer notar, que en este estudio, aún cuando se vieron involucradas distintas cepas bacterianas (ver cuadro 5) en los aislamientos de contenido uterino y tejido uterino de perras con piometra, la que se aisló en mayor porcentaje (86.66%)

de los casos de piometra fue la *Escherichia coli* (cuadro 5), la cual en el caso de perras sanas sólo estuvo relacionada un 6.66% y donde si hubo diferencia estadística. Al revisar la historia clínica de las perras, resulta que esta perra sana que presentó la bacteria, fue la misma que tuvo el grado 1 de hiperplasia endometrial, lo que indica que estaba en camino de desarrollar una piometra.

En este estudio, sólo en 2 casos (6.67%) (perra V y VIII) de perras con piometra, se encontró un contenido estéril en el útero, de estas perras se indagó más información en su historia clínica, observando que a estas hembras se les había administrado medicamento (gentamicina I.M. 4-5 mg/Kg/día durante 5 días) una vez que les fué diagnosticada la piometra, lo que seguramente ocasionó que no se obtuviera aislamiento bacteriano ni en exudado ni tejido uterino.

En este estudio no se encontró sinergismo alguno entre la *E. coli* y otras bacterias; es decir, esta bacteria no inhibió el crecimiento de otras cepas bacterianas ya que tanto en perras sanas como en enfermas, el porcentaje de presentación de las bacterias aisladas fue similar en ambos casos (ver cuadro 5).

Este resultado hace suponer que la presencia de la *E. coli* está relacionada con la presentación de la piometra, como lo publicaron Sandholm (5) y Orskov (11), quienes mencionan a la *E. coli* como agente causal de la enfermedad. Basándose en estas investigaciones, estudios realizados por Nomura (41) y Nomura (44), publicaron que de 161 casos de piometra, en 141 casos (87.6%) se aisló *E. coli*, y un 86.8% de las perras presentaron piometra después de haberseles inoculado *E. coli* a través del cérvix. Nomura ocasionó la piometra en perras a las

que le inoculo la *E. coli* por vía vaginal (12) intrauterina (67), e intracervical (69, 70, 71). Para descartar si la *E. coli* era la causante de la piometra o no, en otro estudio introdujo un pedazo de seda estéril en el interior del útero; en donde sólo observó hiperplasia con infiltrado; típico de rechazo a cuerpo extraño (linfocitario y macrófagos), sin desarrollarse la piometra (60).

Existen investigaciones en donde refieren a la *E. coli* como bacteria patógena facultativa, que crece debido a la estimulación y sensibilización del endometrio, ya que las bacterias se multiplican debido a las secreciones proteicas (leche uterina), y al haber una inmunosupresión por parte de la progesterona durante el diestro, las bacterias siguen multiplicándose e infectando el útero, ya que la respuesta inmunológica esta inhibida por la progesterona (72), Orskov (11) en 1984, publicó que la presencia de esta bacteria interfiere con la captación de P₄ a nivel del receptor endometrial, además de producir una hiperestimulación en los tejidos excretores del organismo (todos aquellos que tienen glándulas endocrinas). Otros investigaciones consideran a la *E. coli* como una bacteria productora de exudado purulento (12, 45, 51, 67, 69 y 71), observación que es importante mencionar, ya que tanto en los resultados de las investigaciones realizadas con anterioridad y los resultados bacteriológicos de este estudio, se puede determinar que en efecto la *E. coli* esta relacionada con la presencia de exudado purulento. Por otra parte, la bacteria se adhiere a la mucosa sin invadirla, pero produciendo la toxina (EIEC), que actúa en la célula glandular estimulando su producción secretora. Además la *E. coli* produce daño a nivel endometrial, el cual fue confirmado desde el momento de abrir el útero en donde se observó la mucosa engrosada, con plegamientos y aspecto edematoso (ver figura 2); al observar los cortes histológicos del endometrio, se observaron cambios estructurales en la piometra tanto en nivel glandular donde se observó

dilatación, cambios degenerativos de la luz uterina con hiperplasia epitelial, así como presencia de material inflamatorio.

La importancia de la relación glándulas:Intersticio fue publicada por Schoon et al. (71), quien lo definió como normal cuando ésta era de 2:1 a favor de las glándulas endometriales, y como anormal cuando esta relación era de 1:2 a favor del intersticio glandular del endometrio de la mujer. La relación anormal se encontró en este estudio en el grupo de perras con piometra, ya que al haber más daño en el tejido uterino de éstas se observa más tejido fibroso, lo que desplaza a las glándulas y por lo tanto la relación glándulas:intersticio se ve afectada, observándose menor cantidad de glándulas pero más grandes en endometrio de perras con piometra que en perras sanas. Lo cual se puede apreciar en las figuras 5 y 6.

En aquellos casos en los que la *E. coli* sólo estaba presente en contenido uterino, la hiperplasia observada fue de tipo de tipo II, III y IV (ver cuadro 8). Cabe hacer mención que cuando estaba presente la *E. coli* en tejido uterino, el daño histológico fue mayor, ya que se encontraron hiperplasias tipo IV y V, observándose una dilatación glandular severa, flora cocoide, hiperplasia quística y vasculitis; coincidiendo con lo observado por Nomura (22, 44), Nomura et. Al (12), Hongyan (73). Estas características no fueron observadas en el endometrio de perras sanas

La *E. Coli* además hiperestimula los tejidos secretores, en este caso el endometrio, esta estimulación acelera el metabolismo celular, razón por la cual se observa en las células glandulares mayor cantidad de vesículas secretoras y aumenta la cantidad de apoptosis como se puede observar en la figura 24 (74).

En este estudio se realizó la observación al microscopio electrónico de transmisión con el fin de observar los posibles cambios ultraestructurales que hubiera en el endometrio de perras con piometra y su comparación con el de perras sanas. No se localizaron estudios de este tipo en útero de perras sanas ni perras con piometra, por lo que resultan interesantes los hallazgos aquí observados. Sin embargo, investigaciones realizadas en hígado y riñón de cerdos, hechas por Nakajima (74), mostraron que las enterotoxinas de la *E. coli* llegan a provocar apoptosis (muerte celular programada), lo que acelera el metabolismo celular y ocasiona los daños en el tejido.

En estas observaciones, se pudo apreciar en las perras sanas las glándulas endometriales con apariencia normal; es decir, presentan de poca a nula secreción, el núcleo permanece en la parte media de la célula y las microvellosidades se observan con distribución regular y tamaño uniforme (figura 12), a diferencia de las perras enfermas, en donde se aprecia una gran cantidad de vesículas secretoras en el citoplasma de las células glandulares (Figura 13), lo que indica que hay estimulación al tejido; se observó una condensación de cromatina muy aparente (Figura 13). Esta lesión coincide con las encontradas en endometrio de perras con piometra, en donde además de verse incrementada la apoptosis (ver figura 24) se observó presencia de adenosis (figura 24) y desorden en la disposición de los tonofilamentos (figura 21).

Cabe notar que tanto en células de las glándulas como del estroma se observó la presencia de vacuolas con contenido proteínico (Figura 11). En las microvellosidades tanto del epitelio uterino como del glandular se observó una hiperplasia adenomatosa en perras con piometra parecida a lo que ocurre en los casos de adenocarcinoma endometrial (Figura 15).

En las células miometriales se observó una gran cantidad de vesículas pinocíticas, lo que indica que hay gran comunicación entre las células miometriales de perras con piometra (Figura 19). El endotelio de perras con piometra (Figura 23) se observó grueso y con proyecciones citoplasmáticas en relación con el endotelio de hembras sanas (Figura 22). En perras sanas no se observaron estas diferencias. Se apreció por lo tanto una diferencia significativa en las estructuras endometriales vistas al microscopio electrónico entre perras sanas y perras con piometra.

VI. CONCLUSIONES

La *E. coli* es la bacteria más frecuentemente aislada en el fluido uterino de perras con piometra. La presencia de esta bacteria esta relacionada con grados más avanzados de lesión.

Las concentraciones de estrógenos son menores en las perras con piometra que en las perras sanas, y las concentraciones de progesterona tienden a ser mayores en las perras con piometra.

El diferente equilibrio hormonal entre las perras sanas y enfermas podría favorecer el establecimiento de la *E. coli* y el desarrollo de piometra.

LITERATURA CITADA

1. Shimada, A.: Fundamentos de Nutrición Animal Comparativa. Sistema de educación continua en producción animal en México, A.C. (1987).
2. Faldyna, M., Laznicka, A., Toman, M.: Immunosuppression in bitches with pyometra. Journal of Small Animal Practice Vol. 42, 5-10 (2001).
3. DeSchepper, J., Van Der Stock, J. & Capiiau, E.: The morphological and biochemical blood profile in (pyometra) in the dog Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 55, 153-162 (1986).
4. Borresen, B : Pyometra in the Dog – A Pathophysiological Investigation. I. The Pyometra syndrome, a review, Nord. Vet. Med. 20, 508-517 (1975).
5. Sandholm, M., Vasenius, H. And Kivistö, A-K-: Pathogenesis of Canine Pyometra. J.A.V.M.A., 167:11, 1006-1010 (Dec. I.1975).
6. Chaffaux, S. And Thibier, M.: Hormonologie Sexuelle de la Chienne. Application au pyomètre. Rec. Méd. Vét., 152 (7-8), 471-481 (1976).
7. Nomura, K.: A survey on Clinical Factor Involved in the Pathogenesis of Canine Pyometra. J. Jnp. Vet. Med. Assoc., 36, 310-315 (1983).
8. Dow, C.: The Cystic Hyperplasia-Pyometra Complex in the Bitch. Vet. Rec. 70:49 (1958)
9. Nomura, K.: Role of Corpus Luteum in Pathogenesis of Canine Pyometra. J.Jnp. Vet. Med. Assoc., 38, 776-781 (1985a).
10. Hadley, J. C : Unconjugated oestrogen and progesterone concentrations in the blood of bitches with false pregnancy and pyometra. Vet. Rec., (Jun 21), 545-547 (1975).

11. Orskov, F.: Genus I. *Escherichia Castellani* and *Chalmers* 1919. In Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1 William & Wilkins (1984).
12. Nomura, K., Yoshida, K., Funahashi, H. and Shimada, Y.: The possibilities of Uterine Invasion of *Escherichia coli* inoculated into the vagina and Development of Endometritis in the Bitches. Jpn. J. Anim. Reprod.; 34:4, 119-203 (1988).
13. Vandeplassche, M., Coryn, M. And DeSchepper, J.: Pyometra in the bitch- cytological, bacteriological, histological and endocrinological characteristics Vlaams Dierneeskundig Tijdschrift 60, 207-211 >(1991).
14. Dhaliwal, G. K. Wray, C. and Noakes, D. E.: Uterine bacterial flora and uterine lesion in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra). Veterinary Record 143, 659-661 (1998).
15. Stone, E. A., Littman, M. P., Robertson, J. L. And Bovee, K. C.: Renal dysfunction in dogs with pyometra Journal of the American Veterinary Medical Association 193, 457-464 (1988).
16. De Buen, de A. N: Citología Diagnóstica veterinaria Manual Moderno ICH editores, México (2001).
17. Olson, N. P. Thrall, M. A., Wykes, P. M., Nett, T. M.: Vaginal Cytology Part I. A Useful Tool for Staging the Canine Estrous Cycle. The Compendium on Continuing Education Vol. 6, No.4, 288-297 (1984).
18. Colombo, G., Baccani, D., Masi, I., Mattioli, M. Straini, RP., Cairoli, F.: Plasma Progesterone and oestrogen levels and the hydroxysteroid dehydrogenase activity of corpora lutea in bitches with pyometra. Clin. Vet., 105: 4/5, 195-20 (1982).
19. Concannon, P. V., Mc Cann, J. P., Temple, M.: Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. J. Reprod. Fert. Suppl. 39, 3-25 (1989).

20. Chaffaux, S., Thibier, M.: Peripheral plasma concentrations of progesterone in the bitch with pyometra. Ann. Rech. Vét., 9 (3), 587-592 (1978).
21. Nelson, R. W., Feldman, E. C.: Pyometra. Vet. Clin. North America, Small Anim. Pract., 16:3, 561-576 (1986).
22. Nomura, K.: Clinical Signs, Intrauterine Bacteria and plasma Progesterone level in in Bitches with Pyometra. J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 36, 310-315 (1984).
23. Hafez, E. S. E.: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales Domésticos. 4ª edición Interamericana (1984).
24. Páramo, R., Esquivel, C.: Inseminación Artificial en perros. Universidad Nacional Autónoma de México. Fac. de Med. Vet. Y Zoot. 1-5 (1994).
25. Sisson, S., Grossman, R. G.: Anatomía de los Animales Domésticos. 5ª edición Salvat 1736-1741 (1982).
26. Galina, H., Saltiel, C., Valencia, M., Becerril, A., Bustamante, C., Calderón, Y., Duchateau, B., Fernández, B., Páramo, R., Zarco, Q.: Reproducción de los Animales Domésticos Limusa-Noriega 361-369 México (1990).
27. Evans, H. E., Delahuanta, A.: Disección del Perro de Miller. Interamericana, México (1981).
28. Concannon, P. W., England, C. W., Verstegen, J. P., Russel, H. A.: Fertility and Infertility in Dogs, Cats and other Carnivores. J. Reprod. Fert. Suppl. 47 (1993).
29. Christiansen, J.: Reproduction in the Dog and Cat. Charter 1, Bailliere Tindall, England (1984).
30. Concannon, P. V., Hansel, W., Visek, W. J.: The ovarian cycle of the bitch: Plasma estrogen, LH and progesterone. Biol. Reprod. 13, 112-121 (1975).

31. Koowatanatawan, G., Polsuwan, C., Nualsri, A., Prachakhadee, D., Rattanaphani, R., Pothiwong, W.: Reproductive effects of medroxyprogesterone acetate in female dogs during 6 months of treatment. Thai. J. Vet. Med. 16:1, 33-49 (1986).
32. Christiansen, J., Schmidt, M.: Ovarian state and Microorganisms in uterine discharge in bitches with pyometra. Dansk Veterinaertidsskrift 65:22, 1043-1047 (1982).
33. Evans, J. M.: The Veterinary Uses of Progestagens. New Zeal. Vet. J. 24:3, 25-34 (1976).
34. Nomura, K.: Progesterone Receptors in the Canine Endometrium Affected with Pyometra. J. Jpn. Vet. Assoc., 38, 174-176 (1985).
35. Clark, J. H., Mani, S. K.: Action of ovarian Steroid Hormones. In the physiology of Reproduction Raven Press, New York, 1011-1057 (1994).
36. Sokolowski, J. H., Zimmerman, R. G.: Effects of the Reproductive Organs of Intact and Ovariectomized Bitches Am. J. Res., 34:12, 1501-1503 (1973).
37. Evans, J. H., Sutton, D. J.: The use of hormones, especially progestagens, to control oestrus in bitches. J. Reprod. Fert. Suppl. 39 163-173 (1989).
38. Sokolowski, J. H., Zimmerman, R. G.: Canine Reproduction: Effects of Multiple treatments of Medroxyprogesterone Acetate on Reproductive Organs of the Bitch. Am. J. Vet. Res., 35:10, 1285-1287
39. Srikanthakumar, A., Ingraham, R.H., Ellsworth, M., Archbald, L. F., Liao, A., Godke, R. A.: Comparison of a solid-phase, no-extraction radioimmunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch and cow. Theriogenology, 26: 779-793 (1986)

40. Púlido, A. A.: Establecimiento de la metodología para el manejo óptimo de muestras de sangre y de leche de ganado cebú (*Bos indicus*) destinadas a la determinación de progesterona por medio de radioinmunoanálisis. Tesis de Maestría, Fac. de Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México (1989).
41. Nomura, K.: Weight and Shape of the Canine with Pyometra. J. Jpn. Vet. Assoc. 38 699-707 (1985b).
42. Bowen, R. A., Olson, P. N., Behrendt, M. D., Wheeler, S L., Husted, P. W., Nett, T. M.: Efficacy and toxicity of estrogens commonly used to terminate canine pregnancy. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 186:8, 783-788, Apr 15 (1985).
43. Albelter, V., Wollinger, F., Coreth, H.: Uber die Behandlung der Verlangerten Laufigkeit mit Proligeston (Delvosteron) Kleintierpraxis 26, 3-6 (1981).
44. Nomura, K.: Canine Pyometra with Endometrial Hyperplasia Experimentally Induced by *E coli* Inoculation. Jpn. J. Vet. Sci. 45 (2), 237-240 (1981).
45. Borresen, B.: Pyometra in the Dog. II- A Pathophysiological Investigation. II. Anamnestic, clinical and reproductive aspects. Nord. Vet. Med., 31, 251-257 (1979).
46. Rieck, G. W.: Studien zur Pathologischen Histologie, Pathogenese und Ätiologie des pyometra-endometritiskomplex der Hündin. I. Die klinische Anatomie und Histopathologie der Pyometra Zbl. Vet-Med. 6-22 (1959).
47. Nelson, R. W., Feldman, E. C., Stabenfeldt, G. H.: Treatment of canine pyometra and endometritis with prostaglandin F₂α. J. A. V. M. A., Vol. 181, No. 9, Nov. 1, 899-903 (1982).
48. Hashimoto, A., Kudo, T., Yazamoe, Iida, I.: Uterine stump pyometra in dogs. Res. Bull. Fac. Agric. Gifu Univ., Vol. 57 201-209 (1992).

49. Johnson, C., A.: Tratamiento Medico de la Piometra Felina. Sección 11 Transtornos reproductores. *Terapeutica Veterinaria de Pequeños Animales*. Interamericana-McGraw-Hill, 1073-1076 (1994).
50. Olson. P. N, Thrall, M. A., Wykes, P. M., Nett. T. M.: Vaginal Cytology. Part II. It Use in Diagnosing Canine Reproductive Disorders. The Compendium on Continuing Education Vol. 6, No. 5, 385-390 (1984).
51. Jonhson, J. R.: Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin. Microbiol. Rev., 4:80-128 (1991).
52. Yuri, K, Nakata, K., Katae, H., Hasegawa, A.: Pathogenicity of *Escherichia coli* from Dogs with UTI in Relation to Urovirulence Factors. J. Vet. Med. Sci. 62 (11): 1197-1200 (2000).
53. Merchant, P.: Bacteriología y Virología Veterinaria. Acribia, España, 286-290 (1980).
54. Mainil, J., seen, L., Charlier, G., Jacquemin, E., China, B., Goffaux, F.: Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* chez les chiens et les chats: II. Données cliniques et bactériologiques sur les souches entéropathogènes. Ann. Méd. Vét., 144, 335-343 (2000).
55. Mainil, J., Bez, S., Jacquemin, E., Kaeckenbeeck, A.: Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* chez les chiens et les chats: I. Détection des souches entérotoxigènes (ETEC), enteropathogènes (EPEC), vérotoxigènes (VTEC), entérohémorragiques (EHEC) et nécrotoxigènes (NTEC), vérotoxigènes (NTEC). Ann. Méd. Vét., 142, 39-46 (1998).

56. Pérez, M. J., Vázquez, M. R., Rodríguez, S. M., Miranda, M. R., Romo, G. A., Nader, G. E.: Procedimientos de Laboratorio para bacteriología y Micología Veterinarias. Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. de Med. Vet. Y Zoot. (1987).
57. Linde-Forsberg, C.: Inseminación Artificial con semen fresco, semen refrigerado diluido y semen congelado en perro Tercer Curso Internacional de Reproducción Canina, Academia de Investigación Biología de la Reproducción, Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. de Med. Vet. Y Zoot., 12-34 (1997).
58. Johnston, S. D., Root Kustritz, M. V., Olson, P. N.: Canine and Feline Theriogenology. W. B. Saunders Company, U. S. A. 206-224 (2001).
59. Corrier, D., Nisbet, D., Scanlan, Ch., Téllez, G., Hargin, B., Deloach, R.: Inhibition of *Salmonella enteritidis* Cecal and Dietary Lactose. Journal in Leghorn Chickes by a Defined Culture of Cecal Bacteria and Dietary Lactose. Journal of Food Protection, Vol 57, May 377-381 (1994).
60. Nomura, K.: Histological Evaluation of Canine Deciduoma Induced by Silk Suture. J. Vet. Med. Sci., 57 (1), 9-16 (1995).
61. Turzillo, A. M., Fortune, J. E. : Supresión of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid associated with delayed ovarian follicular development in heifers. J. Reprod. Fert. 89, 643-653 (1990).
62. Luna, L. G.: Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraw-Hill, New York, U. S. A. (1960).
63. Estrada, F. E., Peralta, Z. L., Rivas, M. P.: Manual de Técnicas Histológicas, A. G. I. Editor, S. A. México (1982).
64. Santander, G.: Técnicas de Microscopía Electrónica en Biología, Aguilar, Madrid (1968).

65. Hayat, M. A.: Principles and techniques of Electron Microscopy Biological a. 3rd Edition (1989).
66. Granados, I., Carvallo, F., Vanda, B., Rosales, L.: Apoptosis. Material didáctico Departamento de Patología, Fac. de Med. Vet. Y Zoot. UNAM.
67. Nomura K: Volume and Nature of Pus Canine Uterus Pyometra Experimentally Produced by Injection of *Escherichia coli* into the Uterus with Cervix Ligated. J. Jpn. Vet. Assoc., 40 494-497 (1987).
68. Fayrer-Hosken, R., Durham, H., Allen, S., Miller-Liebl, M., Caudle, B.: Follicular cystic ovaries and cystic endometrial hyperplasia in a bitch. J.A.V.M.A., Vol 201, No 1, 107-108 (1992).
69. Nomura, K., Funahashi, H., Shimada, Y.: Experimental production of Canine Pyometra by Inoculation with *Escherichia coli* into the Uterus with cervix not Ligated. J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 41, 95-99 (1988).
70. Nomura, K., Masaoka, K., Shimada, Y.: Experimental production of Canine Pyometra by Inoculation with *Escherichia coli* into the Uterus with cervix Ligated. J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 40, 252-256 (1987b).
71. Nomura, K., Masaoka, K., Shimada, Y.: Weight and Shape of the Canine Uterus with Pyometra Experimentally Reproduced by *Escherichia coli* Inoculated into the Uterus with the Cervix Ligated. J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 41, 95-99 (1988).
72. Schoon, H., A., Shoon, D., Nolte, I.: Untersuchungen zur Pathogenese des "Endometritis-Pyometra-Komplexes" des Hundin. J. Vet. Med. A 39, 43-56 (1992).

73. Hongyan, A.: Analyse génétique des déterminants de la virulence de souches d'*Escherichia coli* attachantes et effaçantes isolées chez le porc et le chien. Le Médecin Vétérinaire du Québec Vol.30, No.1 54 (2000).
74. Nakajima, Y., Mikami, O., Yocsioka, M., Arai, S., Miura, K., Koike, Y., Sato, M., Kobashi, M., Nakajima, E : Involvement of Apoptosis in the Endotoxemic Lesion of Liver and Kidneys of Piglets J. Vet. Med.Sci. 62 (6): 621-626 (2000).