

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS – PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Estudo da microflora residente na vagina cranial, colo e útero de
cadelas híidas em diferentes fases do ciclo estral, atendidas no
HV/CSTR -UFCG**

Danielle Aluska do Nascimento Pessoa

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PATOS – PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Estudo da microflora residente na vagina cranial, colo e útero de
cadelas híidas em diferentes fases do ciclo estral, atendidas no
HV/CSTR -UFCG**

Danielle Aluska do Nascimento Pessoa

Graduanda

Profa. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo

Orientadora

Patos -PB
Junho de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

DANIELLE ALUSKA DO NASCIMENTO PESSOA
Graduanda

**Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial
para obtenção do grau de Médico Veterinário.**

ENTREGUE EM/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo
Orientadora

Nota

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro
Examinador I

Nota

Prof. Dr. Albério Antônio de Barros Gomes
Examinador II

Nota

A Deus, minha fortaleza, meu refúgio. Pelo amor e fidelidade.

Aos meus pais Jomar e Célia, pelo amor, confiança e orações para a concretização de mais um sonho.

A minha filha Maria Vitória, por ser a razão da minha vida, pelo seu amor e inocência.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida mesmo nos momentos nos quais quis fraquejar, Ele sempre me encorajou a lutar, a persistir, para que seus planos em minha vida fossem concretizados.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação que cuidaram e cuidam de minha filha enquanto batalho pelos meus sonhos, só consegui ficar distante porque tinha certeza que ela estava em boas mãos.

Aos meus avós paternos, João e Marta, pelo amor e apoio financeiro, por acreditarem e investirem no meu sonho.

Aos meus irmãos, Vanessa e Raphael, pela cumplicidade e companheirismo, que mesmo com a distância me dedicaram.

À Dra Rosileide, por me ajudar com seus conhecimentos na construção inicial do trabalho, sem sua ajuda e amizade nada seria concretizado.

À Profa. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo, minha orientadora, pela paciência, motivação e confiança no meu trabalho.

Às minhas amigas, Carla e Rê, irmãs que a vida me deu. Obrigada pela amizade, companheirismo, força e presença em todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus colegas de turma, pelos momentos de alegria e também de muita briga, mas com certeza serão momentos dos quais jamais me esquecerei.

Aos professores, pelo conhecimento transmitido, que favoreceu o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Pedro Izidro e aos alunos da disciplina de Anestesiologia e Técnica Cirúrgica, que me ajudaram a concretizar uma parte do meu estudo.

Ao Prof. Felício, Layse e Rodrigo, que me ajudaram no Laboratório de Microbiologia Veterinária, obrigada pela paciência e disposição para realização do meu trabalho.

À Verinha, médica veterinária, do Laboratório de Reprodução Animal, pela disposição e ajuda.

Aos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

A todos muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	0	Erro! Indicador não definido.
ABSTRACT		Erro! Indicador não definido.
1 INTRODUÇÃO.....		Erro! Indicador não definido.
2 REVISÃO DE LITERATURA		Erro! Indicador não definido.
2.1 O Ciclo Estral nas Cadelas.....		Erro! Indicador não definido.
2.1.1 Proestro		Erro! Indicador não definido.
2.1.2 Estro		Erro! Indicador não definido.6
2.1.3 Diestro		Erro! Indicador não definido.6
2.1.4 Anestro		Erro! Indicador não definido.
2.2 Citologia Vaginal.....		Erro! Indicador não definido.7
2.2.1 Características citológicas nas diferentes fases do ciclo estral.....		Erro! Indicador não definido.
2.3 Microorganismos colonizadores do Trato Reprodutivo	20	
2.3.1 <i>Escherichia coli</i>		Erro! Indicador não definido.2
2.3.2 <i>Staphylococcus spp</i>		Erro! Indicador não definido.3
2.3.3 <i>Streptococcus spp</i>		Erro! Indicador não definido.3
3 MATERIAL E MÉTODOS		Erro! Indicador não definido.5
3.1 Animais e local do experimento		Erro! Indicador não definido.5
3.2 Avaliações realizadas.....		Erro! Indicador não definido.5
3.3 Coleta do material		Erro! Indicador não definido.5
3.3.1 Microbiologia vaginal.....		Erro! Indicador não definido.5
3.3.2 Microbiologia uterina		Erro! Indicador não definido.6
3.4 Realização da OSH.....		Erro! Indicador não definido.6
3.5 Análises laboratoriais		Erro! Indicador não definido.8
3.5.1 Citologia vaginal.....		Erro! Indicador não definido.8
3.5.2 Cultura microbiológica: vaginal e uterina.....		Erro! Indicador não definido.8
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30	
5 CONCLUSÃO	34	
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		Erro! Indicador não definido.5

Lista de tabelas

Tabela 1 – Dados da citologia vaginal de fêmeas caninas em diferentes idades e fases do ciclo estral, submetidas a OSH no HV/CSTR UFCG.....	30
Tabela 2 – Tipos de bactérias isoladas em diferentes regiões do trato genital das fêmeas caninas submetidas a OSH no HV/CSTR-UFCG.....	32

Lista de figuras

Figura 1 - Secção sagital do vestíbulo, vagina e cérvix de uma cadela durante o anestro (A) e do proestro /estro (B).....	12
Figura 2 - Esquema representativo do Eixo-hipotalâmico-hipofisário-gonadal feminino.....	14
Figura 3 - O ciclo estral canino.....	15
Figura 4 - Alterações citológicas nas células vaginais, durante o ciclo estral....	17
Figura 5 - Fase de Proestro.....	19
Figura 6 - Fase de Estro.....	19
Figura 7 - Fase de Diestro.....	20
Figura 8 - <i>Escherichia coli</i>	22
Figura 9 - Técnica utilizada na ovariossalpingohisterectomia.....	27
Figura 10 - Técnica de inoculação em placa para obtenção de colônias isoladas em meio sólido.....	29
Figura 11 - Teste da catalase.....	29

RESUMO

PESSOA, DANIELLE ALUSKA DO NASCIMENTO. Estudo da Microflora residente na vagina cranial, colo e útero de cadelas híidas, em diferentes fases do ciclo estral, atendidas no HV/CSTR – UFCG. Patos, UFCG. 2011 40p. (Trabalho de conclusão de curso em Medicina Veterinária, Reprodução Animal).

O ciclo estral das fêmeas na espécie canina acarreta em alterações hormonais, comportamentais e modificações no trato reprodutivo. Na fase de transição do proestro para o estro ocorre a abertura e relaxamento da cérvix, facilitando a migração de microorganismos da vagina para útero, que podem, dependendo do estado imunológico do animal, causar doenças como a piometra. O objetivo do presente estudo foi identificar quais os principais microorganismos colonizadores do trato reprodutivo de cadelas saudáveis e relacionar a presença desses com a fase do ciclo estral. Foram utilizadas 13 cadelas híidas, nas diferentes fases do ciclo estral, submetidas a OSH (ovariossalpingohisterectomia) eletiva no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, na cidade de Patos. Para a realização da cultura microbiológica vaginal e uterina foram feitos *swabs* da região da vagina cranial, colo e útero. A partir dessas amostras foi realizada a semeadura e isolamento dos microorganismos. A determinação da fase do ciclo estral foi realizada por meio de citologia vaginal. A fase do ciclo estral com maior percentual de microorganismos isolados foi o diestro, sendo eles: Bacilos Gram-negativos, Bacilos Gram-positivos, Cocos Gram-positivos e *Staphylococcus*.

Palavras-chaves: Cadelas. Piometra. Microflora.

ABSTRACT

PESSOA, DANIELLE ALUSKA DO NASCIMENTO. Study of the resident microflora in the vagina cranial and uterus in bitches in different stages of reproductive cycle, at the HV/CSTR - UFCG. Patos, UFCG. 2011 40p. (Monograph – Veterinary Medicine, Animal Reproduction).

The reproductive cycle of bitches leads to hormonal and behavioral changes in the reproductive tract. In the transition from proestrus to estrus occurs openness and relaxation of the cervix, facilitating the migration of microorganisms from the vagina to the uterus, leading to diseases as pyometra. The aim of this study was to identify the microorganisms colonizing the reproductive tract of healthy bitches and relate their presence to the stage of the reproductive cycle. Thirteen healthy bitches were used in the different phases of the estrous cycle and submitted to OSH (ovariohysterectomy) in the Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande – Patos. To perform the microbiological culture and uterine vaginal, swabs were made in the region of the cranial vagina, cervix and uterus. From these swabs was performed the isolation of microorganisms. The determination of cycle phase was performed by vaginal cytology. The reproductive phase with highest percentage of isolation was the diestrus and the microorganisms isolated from the reproductive tract of bitches were: bacilos Gram-negative, bacilos Gram-positive, cocos Gram-positive e *Staphylococcus* spp.

Keywords: Bitches. Pyometra. Microflora.

1 INTRODUÇÃO

O cão (*Canis familiares*) é o mamífero canídeo provavelmente oriundo do lobo cinzento no continente asiático há mais de 100 000 anos, sendo considerado o mais antigo animal domesticado pelo homem. Com a domesticação, essa espécie foi se tornando cada dia mais importante na vida do ser humano, devido as suas aptidões e seu comportamento, fazendo com que muitos deles sejam considerados até como membros da família pelos humanos.

As fêmeas da espécie canina são monoéstricas não estacionárias, ou seja, apresentam mais ou menos dois ciclos estrais durante um ano, independente das estações do ano, sendo o ciclo estral dividido basicamente em quatro fases: proestro, estro, diestro e anestro. Essa é uma característica própria da espécie, podendo acontecer diferenças entre cada individuo relacionadas com a duração de cada fase do ciclo estral.

O trato reprodutivo sofre modificações significativas durante as fases do ciclo, devido à ação de hormônios, como por exemplo, o estrógeno, também conhecido como estradiol. Este é responsável por desenvolver na cadela as características do estro, sendo uma delas a aceitação ao macho. De acordo com os estudos de Watts; Wright e Whithear, (1996); Feldman, (2004) é na fase de transição do proestro para o estro que a cérvix encontra-se relaxada, aberta e pregueada (figura 1), favorecendo a proliferação e migração de microrganismos para o útero, tanto dos já existentes no trato reprodutivo, como dos deixados pelo macho no momento da cópula, podendo ocasionar infecções.

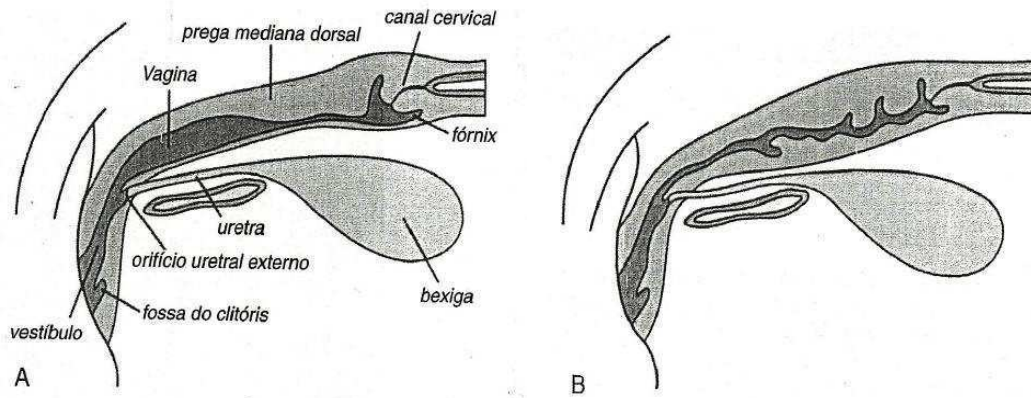


Figura 1 - Secção sagital do vestibulo, vagina e cervix de uma cadela durante o anestro (A) e do proestro/estro (B). **Fonte:** ETTINGER, (2004).

Com a ovulação há a formação do corpo lúteo no ovário e a secreção de progesterona, então a fêmea entra na fase do diestro ou fase progesterônica, na qual, a mesma se expõe por um longo período de tempo à progesterona produzida, que é um hormônio imunossupressivo, além de ser responsável pela manutenção da gestação. A atividade contrátil do miométrio também diminui, permitindo um acúmulo de secreções glandulares uterinas, transformando o útero em um ótimo local de cultivo bacteriano, geralmente para as bactérias da flora vaginal (FELDMAN, 2004).

A colonização do útero por microorganismos patógenos determina uma enfermidade grave chamada de Piometra que pode causar complicações renais, hepáticas e sistêmicas, muitas vezes ocasionando a morte da fêmea.

Estudos realizados por Carneiro; Toniollo e Schocken-iturrino, (2004), Baba; Furkata e Arakawa, (1983), Watts; Wright e Whithear, (1996) e Avila; Camargo; Benetti e Alarcon, (2008) têm revelado que microorganismos podem colonizar o trato reprodutivo de cadelas saudáveis. No entanto, na nossa região nunca foi realizado um estudo nesse sentido e também não se sabe quais são os principais microorganismos residentes no seu trato reprodutivo e nem como o manejo reprodutivo e o número deaios apresentados poderão influenciar na contaminação do trato reprodutivo.

O objetivo deste estudo será, portanto, contribuir com informações que poderão ajudar a compreender quais os agentes patógenos que frequentemente colonizam o trato reprodutivo de cadelas e como o manejo reprodutivo pode influenciar nesse aspecto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Ciclo Estral nas Cadelas

Para que as fêmeas iniciem seus ciclos reprodutivos, elas devem passar por um processo chamado de Puberdade, termo utilizado para definir o início da vida reprodutiva, mais precisamente a época da primeira ovulação. A cadela atinge a puberdade, em média, entre 6 e 12 meses (CUNNINGHAM, 2004).

A regulação do ciclo estral acontece por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos que são os hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas produzidas pela adenohipófise e os esteróides secretados pelos ovários. O controle da secreção das gonadotrofinas durante o ciclo estral exige um delicado balanço entre as complexas interações hormonais. Núcleos hipotalâmicos secretam GnRH, que através de um sistema circulatório especial, chamado sistema porta hipotalâmico-hipofisário (figura 1), estimulam a adenohipófise a secretar o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), que na corrente circulatória promovem a síntese de estrógeno e progesterona pelos ovários. Estes dois últimos exercem influências, através de mecanismos de feedback positivo ou negativo, diretamente na hipófise ou no hipotálamo, tornando possível a continuidade dos eventos cíclicos que caracterizam o ciclo estral (MC'DONALD, 1989).

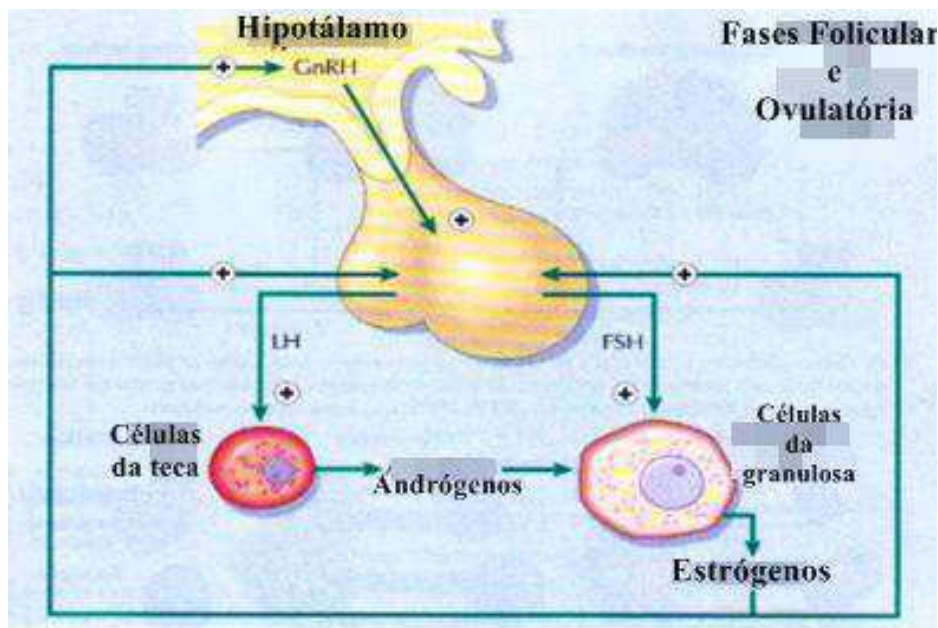


Figura 2 - Esquema representativo do Eixo hipotalâmico hipofisário gonadal feminino. **Fonte:** PERKINS, (2002).

O ciclo estral na cadela é dividido em quatro estágios, de acordo com alterações comportamentais e hormonais: Proestro, Estro, Diestro e Anestro. Pode ser dividido também de acordo com a função ovariana: fase folicular, fase da luteinização pré ovulatória e ovulação, fase luteínica e anestro (SCHAEFERS-OKKENS, 2004).

Cada fase do ciclo estral é regulada por determinado hormônio (figura 3). Picos esporádicos de secreção de hormônio luteinizante (LH) e variações de secreção de hormônio foliculo estimulante (FSH) liberados pela hipófise ocorrem por todo o anestro e são, com frequência, similares em sua magnitude ao pico periovulatório. Do início do anestro em diante, existe um aumento na secreção de FSH, que não é acompanhada pela secreção de LH, até o final do anestro, quando ocorre um aumento na frequência e amplitude de pulsos de LH. O término do anestro depende das mudanças na pulsatilidade do FSH e do LH e também da maior possibilidade de resposta ovariana às gonadotrofinas (REECE, 1996).

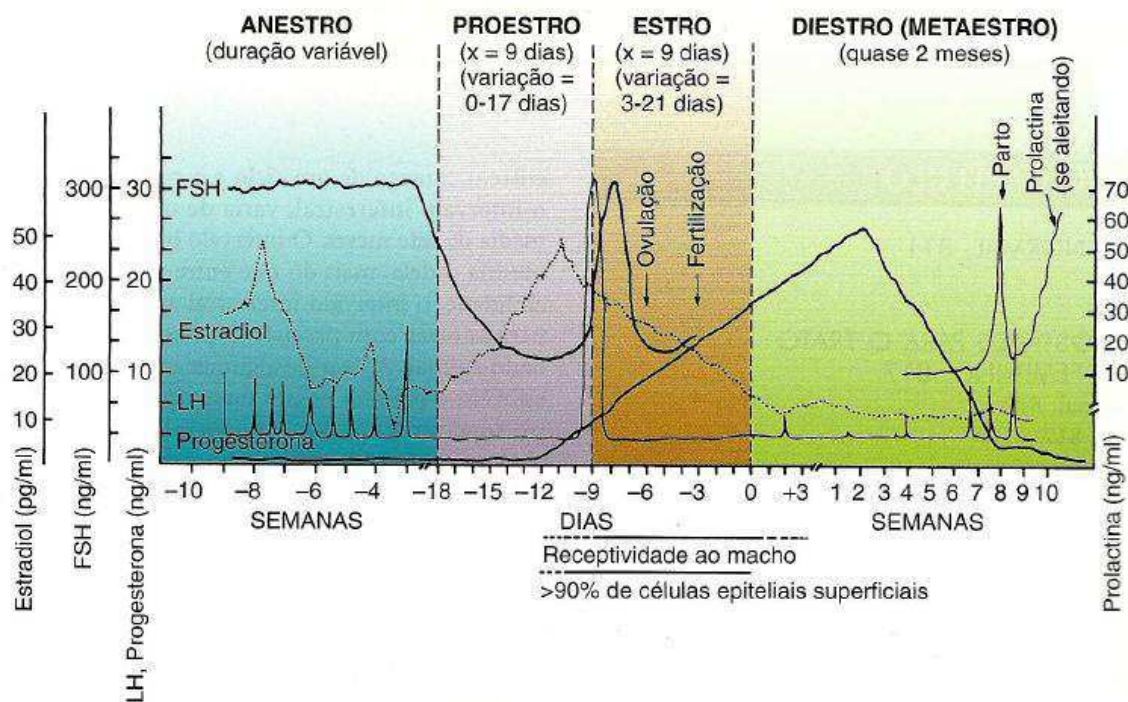


Figura 3 - O Ciclo estral canino. **Fonte:** MORROW, (1986).

Independentemente dos fatores iniciantes, os folículos ovarianos desenvolvem-se, maturam e secretam 17- β -estradiol durante o proestro. A diminuição da concentração sérica de estradiol e o aumento na concentração de progesterona ao final do proestro são considerados responsáveis pelo início da mudança de comportamento associada ao início do estro e pela indução ao pico pré-ovulatório da secreção de FSH e LH. A secreção lútea de progesterona depende do LH e prolactina hipofisários. A concentração sérica de progesterona aumenta rapidamente durante as primeiras duas semanas após o pico de LH e a ovulação (JOHNSON, 2006).

2.1.1 Proestro

A média de duração do proestro é de 9 dias, com variação de 3 a 17 dias. Durante este período, a fêmea apresenta a vulva edemaciada e hipertrofiada, a cérvix dilatada, o endométrio espessado, há aumento na atividade glandular e uma descarga vaginal hemorrágica, causada pela diapedese eritrocitária através do endométrio e ruptura capilar sub epitelial. A manifestação comportamental da fêmea caracteriza-se pela atração do macho, sem permitir a cópula (FELDMAN; NELSON, 1996).

2.1.2 Estro

Em média, o estro (período de cruzamento) tem duração de 9 dias, com variação de 3 a 21 dias. Durante o estro a vulva começa a diminuir e torna-se macia. Em geral, o corrimento vaginal persiste, mas comumente diminui, podendo permanecer serossanguinolento ou apresentar coloração amarelo-palha (SCHAEFERS-OKKENS, 2004).

A cadela começa a exibir os sinais do estro, quando a concentração de estrógeno circulante começa a declinar e a progesterona sérica aumenta. Este fato deve-se à luteinização das células da granulosa dos folículos maduros, que passam a produzir progesterona levando ao aumento de sua concentração no sangue. Na presença do macho, a fêmea dirige a região posterior em sua direção, abaixa o dorso e eleva a região pélvica, exhibe a região perineal e ondula a cauda para um dos lados (OLIVEIRA; MARQUES; NEVES, 2003).

2.1.3 Diestro

É definido como o período compreendido entre a parada do estro até o tempo durante o qual a progesterona é secretada pelo corpo lúteo. Apresenta duração de em média 56 a 58 dias. O diestro começa quando uma cadela previamente receptiva abruptamente recusa a aceitar a monta de um macho. Ela pode também não ser mais atrativa para os machos. A vulva retorna ao normal e não é mais flácida (MUSOLINO; GHIRELLI; MORENO, 2000).

2.1.4 Anestro

É a fase de involução e reparo uterino, ocorrendo no final da fase lútea até o início da fase folicular seguinte. Não há alteração, clinicamente, capaz de distinguir o término do diestro e início do anestro em fêmeas não prenhes. A duração do anestro nas fêmeas prenhes é de, em média, 4,5 meses, e ele vai do parto até o próximo proestro (RODRIGUES; RODRIGUES, 2002).

2.2 Citologia vaginal

A citologia esfoliativa da vagina consiste no estudo das células naturalmente descamadas ou retiradas artificialmente da superfície dos tecidos. A mucosa vaginal e as células epiteliais vaginais sofrem alterações morfológicas sob a ação das concentrações crescentes de estrógenos (figura 4). Estes estimulam a proliferação do epitélio vaginal, que passa de uma espessura de poucas camadas celulares no anestro para uma espessura de 20 a 30 (até 100-150) camadas de células no fim do proestro. O afastamento das células epiteliais da membrana basal epitelial enceta um processo degenerativo de morte celular associado à queratinização (cornificação) citoplasmática (ALVES; MATHEUS; COSTA, 2002). É uma das técnicas citológicas mais utilizadas na prática veterinária com o objetivo de otimizar o acasalamento de animais (RAPOSO; SILVA, 1999).

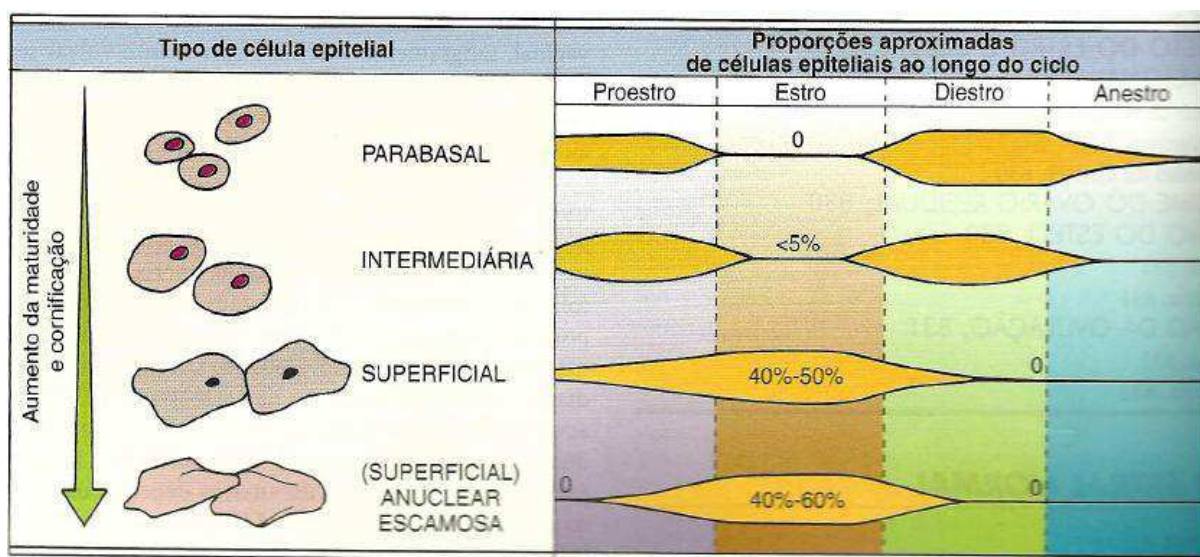


Figura 4 - Alterações citológicas nas células vaginais, durante o ciclo estral. **Fonte:** JOHNSON, (2006).

O *swab* é inserido na comissura dorsal da vulva, de modo a evitar a fossa ventral do clitóris, visto que as células escamosas superficiais queratinizadas presentes neste local podem influenciar a interpretação citológica. Avança-se o em um ângulo de 45 ° para cerca de metade do comprimento da haste, gira-se o *swab* e puxa-o para fora. Em seguida, esfrega-o em uma lâmina de vidro, deixa-o secar e logo após realiza-se a coloração mais comumente pelo método panótico rápido. Nenhum efeito colateral negativo é relatado para este procedimento (KUSTRITZ, 2006).

Quatro tipos de células do epitélio da vagina podem ser identificados mediante citologia esfoliativa. Pela ordem, da célula mais profunda e mais imatura até a mais superficial e madura, constata-se as células basais, parabasais, intermediárias e superficiais (HENSON, 2003).

As células basais localizam-se ao longo da membrana basal e originam outros tipos de células epiteliais observadas no esfregaço vaginal (THRALL; OLSON, 1999). Núcleos arredondados e quantidade escassa de citoplasma basofílico caracterizam estas pequenas células. Devido à sua profunda localização, as células basais raramente são observadas nas preparações vaginais (HENSON, 2003).

As células parabasais são as menores células epiteliais observadas no exame citológico de rotina das amostras da vagina. Estas células apresentam alta proporção núcleo: citoplasma, núcleos arredondados de tamanho e forma uniformes e citoplasma basofílico. As células parabasais que contêm vacúolos citoplasmáticos são denominadas células espumosas; o significado dos vacúolos é desconhecido (OLSON *et al.*, 1984).

As células intermediárias variam em tamanho podendo ser classificadas em células intermediárias pequenas e grandes. Apresentam bordos irregulares e núcleos geralmente menores que aqueles das parabasais (MUSOLINO; GHIRELLI; MORENO, 2000).

As células superficiais são células grandes, mortas e irregulares que representam o fim do processo que se inicia com as células parabasais. Morreram devido ao espessamento da parede que as afastou do suprimento sanguíneo. São grandes com bordas anguladas e achatadas, também já foram chamadas de células queratinizadas ou cornificadas (BEZERRA; PINA, 2004).

2.2.1 Características citológicas nas diferentes fases do ciclo estral

Durante a fase do proestro, na citologia vaginal, à medida que aumenta a concentração de estradiol, o epitélio vaginal prolifera e as hemácias deixam os capilares uterinos por diapedese. Ao fundo do esfregaço pode haver um aspecto de “sujeira” devido à presença de muco (BAKER; LUMSDEN, 1999) (Figura 5). Do início ao meio do proestro, uma população de neutrófilos e uma mistura de células epiteliais superficiais, parabasais e intermediárias, pode ser observada. Quantidades variáveis de bactérias também podem ser observadas no fundo da lâmina. À medida que o proestro

evolui, há redução da quantidade de neutrófilos, com predomínio de células epiteliais superficiais (OLSON *et al.*, 1984).

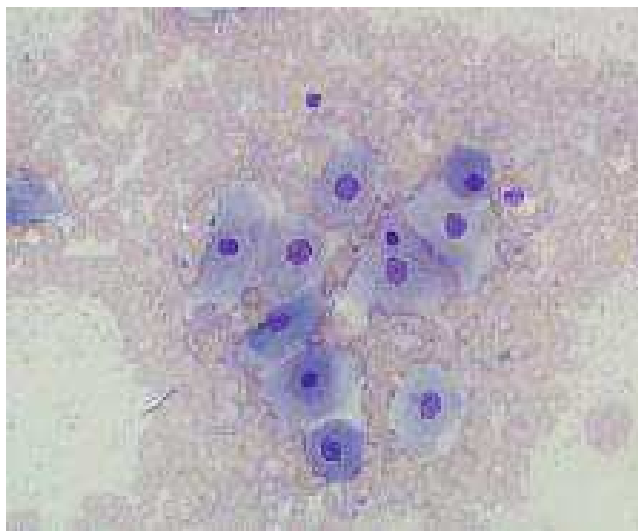


Figura 5- Fase de Proestro. **Fonte:** Arquivo pessoal.

O esfregaço vaginal na fase do estro permanece geralmente constante, com a totalidade da lâmina apresentando células superficiais totalmente queratinizadas (período de máxima influência estrogênica). Eritrócitos geralmente são encontrados e o aspecto do esfregaço é claro, raramente ocorrem mudanças até o diestro (Figura 6) (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS, 1997).



Figura 6- Fase de Estro. **Fonte:** Arquivo pessoal.

A fase do diestro caracteriza-se citologicamente por uma redução abrupta de 20% na quantidade de células superficiais e um aumento de 15% a 20% no número de pequenas células intermediárias (Figura 7). Com frequência, os neutrófilos reaparecem durante o diestro. Alguns neutrófilos de cadelas normais no diestro contêm bactérias fagocitadas (HOLST; PHERMISTER, 1974).

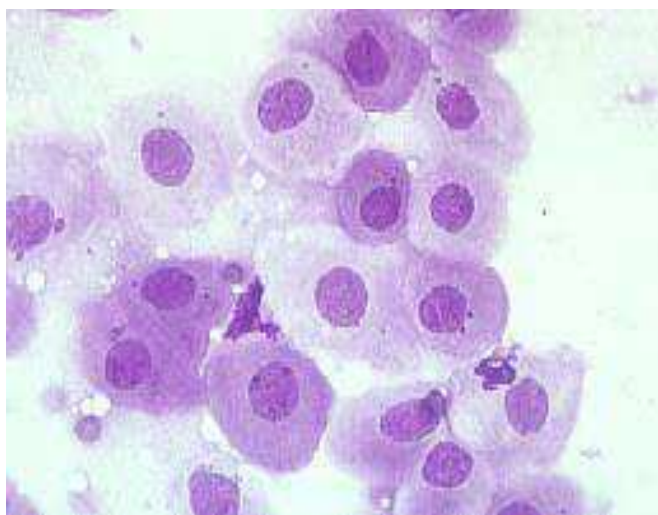


Figura 7- Fase de Diestro. **Fonte:** Arquivo pessoal.

Na fase do anestro, durante a avaliação citológica vaginal, as células predominantes são parabasais e intermediárias, durante toda a fase o aspecto da lâmina se altera minimamente. Podem ser observados neutrófilos e bactérias da flora normal. O número de células é pequeno e estas se mostram bastante espaçadas, sendo possível encontrar células com citoplasma degenerado (citólise) (WRIGHT; PARRY, 1989).

2.3 Microorganismos colonizadores do trato reprodutivo

O trato genital feminino possui uma flora microbiana residente desde suas regiões externas ao óstio cervical. Normalmente, o útero é desprovido de microorganismos ou transitoriamente contaminado com pequeno número deles. A vagina contém flora composta principalmente por espécies de bactérias anaeróbias obrigatórias, incluindo espécies Gram-negativas e Gram-positivas. A função desempenhada pela flora normal da vagina é incerta. Entretanto, assim como em outras superfícies mucosas, a flora deve ser considerada protetora, possivelmente com a

exclusão de cepas mais patogênicas. De forma mais prática, a flora normal contém espécies que irão contaminar o útero, podendo torná-lo comprometido (HIRSH, 2003).

O isolamento de microorganismos da microbiota endógena, geralmente considerados de pouca virulência, alerta para o fato de que estes não podem ser desprezados automaticamente como contaminantes. Ao contrário, é possível que tenham grande importância clínica, devido a fatores (administração de drogas imunossupressoras) que podem ocasionar na modificação da microbiota endógena, provocando a infecção (SOUZA; SCARCELLI, 2000).

Praticamente todas as cadelas normais abrigam bactérias aeróbias no trato vaginal, sendo as mais comuns: *Pasteurella multocida*, Estreptococos β -hemolíticos, *Escherichia coli*, Bastonetes Gram positivos não classificados, Bastonetes Gram negativos não classificados, Subespécies de *Mycoplasma*, Subespécies de *Pasteurella* e Subespécies de *Streptococcus* (SCHAEFERS-OKKENS, 2004).

A doença uterina significativa ou algum outro fator de predisposição favorece o desenvolvimento de piometra na cadela, porque bactérias contaminam o útero em cadelas normais sem haver desenvolvimento de piometra. A bactéria mais associada a piometra é a *Escherichia coli*, mas outras bactérias como estafilococos, estreptococos, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Serratia* foram isoladas do útero de cadelas com piometra. Todas essas bactérias, em isolados únicos ou múltiplos, foram identificadas no trato vaginal de cadelas saudáveis normais (FELDMAN, 2004).

Os microorganismos que constituem a flora vaginal normal, em sua maioria, também são patógenos potenciais. Sendo divididos em bactérias aeróbias: *Escherichia coli*, Estafilococos coagulase + e -, Estreptococos alfa - e beta-hemolíticos, Estreptococos não-hemolíticos, *Proteus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Neisseria*, *Micrococcus*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus* e *Enterobacter*; e bactérias anaeróbicas: *Bacteroides melaninogenicus*, *Corynebacterium*, *Haemophilus aphrophilus*, *Bacteroides*, Enterococos anaeróbicos, *Peptostreptococcus* (hemolítico e não-hemolítico), *Mycoplasma* e *Ureaplasma* (JOHNSON, 1994).

2.3.1 *Escherichia coli*

Pertence a família *Enterobacteriaceae*, composta por bacilos Gram-negativos de até 3 μm de comprimento que fermentam a glicose e ampla variedade de outros açúcares. São oxidase-negativo, catalase-positivos, fermentam a lactose e causam uma série de infecções clínicas. A *Escherichia coli* é geralmente móvel, com flagelos peritríquios e frequentemente fimbriada (figura 5) (QUINN *et. al.*, 2005).

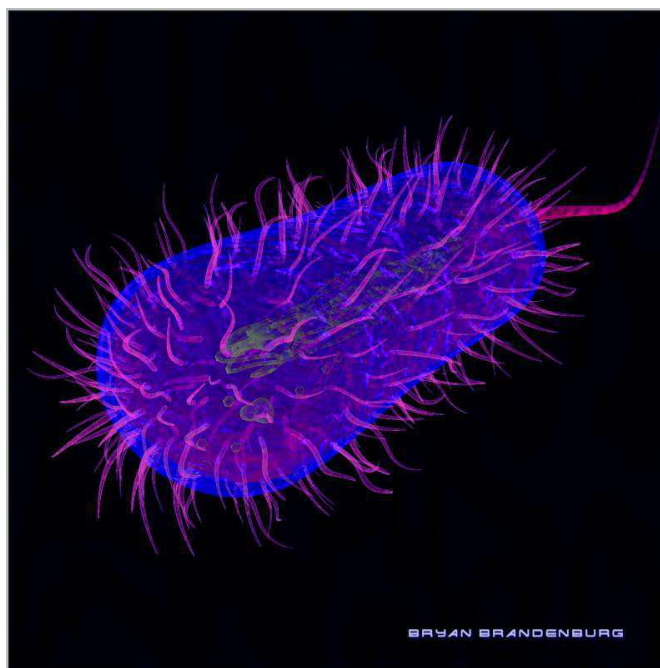


Figura 8 – *Escherichia coli*. **Fonte:** www.pilotspoint.net

A colonização do trato intestinal de mamíferos por *E. coli* de fontes ambientais ocorre logo após o nascimento. Esses microorganismos persistem como membros importantes da microbiota normal do intestino por toda a vida. Muitas linhagens de *E. coli* são de baixa virulência, mas podem causar infecções oportunistas em localização extra-intestinal, como glândula mamária, trato urinário e o útero. Linhagens patogênicas de *E. coli* possuem fatores de virulência que permitem a colonização das superfícies mucosas e a subsequente produção de doença. Fatores predisponentes que permitem colonização e tornam os animais suscetíveis ao desenvolvimento de doença clínica incluem idade, estado imunológico, natureza da dieta e grande exposição a linhagens patogênicas (QUINN *et. al.*, 2005).

A *E. coli* é uma espécie universal e, como tal, faz parte da microbiota normal ou causa infecção numa vasta gama de animais domésticos e silvestres (SILVA; CAMPOS, 2008).

2.3.2 *Staphylococcus* spp

O nome desse gênero é derivado do termo grego *staphylé*, que significa “um cacho de uvas”, por causa do padrão de crescimento dessas bactérias. São cocos Gram-positivos (grupo heterogêneo de bactérias, que se caracteriza por apresentarem em comum forma esférica, coloração de Gram e ausência de endósporos), com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, anaeróbios facultativos (i.e., crescem em ambas as condições, aeróbica e anaerobicamente) e catalase positivos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006). Ocorrem como comensais da pele e mucosas do trato respiratório superior, urogenital inferior e como transitórios no trato digestivo. São relativamente estáveis no meio ambiente. Linhagens de estafilococos exibem afinidade seletiva por espécies particulares de animais, por exemplo, o *Staphylococcus intermedius* que é comumente isolado de endometrite em cães (QUINN *et al.*, 2005).

A infecção estafilocócica apresenta-se com uma ampla variedade de síndromes afetando muitos tecidos e é causada por três mecanismos: destruição local (abscesso), disseminação pela corrente sanguínea e produção de toxina (SPICER, 2002).

2.3.3 *Streptococcus* spp.

São cocos Gram-positivos, com aproximadamente 1 μm de diâmetro, que formam cadeias de diferentes comprimentos. Podem infectar muitas espécies de animais, causando infecções supurativas como mastite, metrite, poliartrite e meningite. Muitas espécies vivem como comensais na mucosa do trato respiratório superior e no trato urogenital inferior. São frágeis, sensíveis a dessecação, catalase negativos e sobrevivem somente por curto período fora do hospedeiro, por isso são considerados patógenos oportunistas (QUINN *et al.*, 2005).

A identificação dos *Streptococcus* é, até hoje, relativamente complexa e fundamentada num sistema dicotômico, com base na observação inicial das propriedades hemolíticas das amostras. Dessa forma, são classificados em β -hemolíticos

(quando causam a lise total das hemácias), α -hemolíticos (causam a lise parcial das hemácias) e gama (não provocam lise das hemácias) (TEIXEIRA; MERQUIOR; TRABULSI, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e local do experimento

Foram utilizadas 13 fêmeas caninas saudáveis clinicamente, sendo oito sem raça definida, duas Poodle, duas Pinscher e uma Teckel, com idades variando entre 6 meses e 12 anos, em diferentes fases do ciclo estral, submetidas à Ovariossalpingohisterectomia (OSH), no período de Junho a Agosto de 2010. Sete dessas fêmeas foram submetidas à OSH na disciplina de Anestesiologia e Técnica Cirúrgica no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande/ Campus de Patos – PB e as outras seis chegaram ao HV para realização de OSH como método contraceptivo.

3.2 Avaliações realizadas

No experimento foram realizadas as seguintes avaliações: coleta de material biológico para cultura microbiológica vaginal e uterina e para citologia vaginal.

3.3 Coleta de material

Foram realizadas coletas de material biológico para avaliações da microbiologia vaginal e uterina, e para citologia vaginal.

3.3.1 Microbiologia Vaginal

As amostras de conteúdo vaginal foram coletadas por via de colocação de espéculo ginecológico, para melhor acesso a porção cranial da vagina e da cérvix, nas quais a coleta foi feita com a ajuda de *swab* estéril (antes do processo cirúrgico).

3.3.2 Microbiologia Uterina

A coleta de conteúdo uterino foi realizada com o auxílio de um *swab* estéril após a intervenção cirúrgica (OSH).

3.4 Realização da OSH

As cadelas foram sedadas com acepran e diazepam, para que a tricotomia da área a ser cirurgiada fosse realizada, logo após foi feita a anestesia local epidural com lidocaína e a anestesia geral com propofol, a indução anestésica foi feita com halotano, por meio de anestesia inalatória.

A técnica utilizada na cirurgia (figura 9) foi segundo STONE, (2007), e respeitando todos os princípios de assepsia. Inicialmente foi feita uma incisão pré retro umbilical, pois os ovários na cadela são mais difíceis de exteriorizar do que o corpo uterino, em seguida, o corno uterino direito foi localizado com o dedo indicador, e por meio dele localizou-se o ovário direito, logo após uma pinça foi aplicada no ligamento próprio do ovário (figura A) sendo utilizada para a retração do ovário enquanto o ligamento suspensor foi rompido com o dedo indicador (figura B).

O pedículo ovariano foi triplamente pinçado e seccionado entre a pinça mais próxima do ovário e a intermediária (figura C). A pinça mais distante do ovário foi retirada, de modo que a ligadura do pedículo pudesse ser aplicada no sulco deixado por ela (figura D), sendo o material utilizado nessas ligaduras do tipo absorvível. Seguidamente, o ligamento largo do útero foi seccionado (figura E). Três pinças foram colocadas no corpo uterino imediatamente cranial à cérvix (figura F), foi realizada uma secção entre as pinças proximal e intermediária. A pinça caudal foi removida, e o útero foi ligado por transfixação no sulco deixado pelo instrumento. O pedículo uterino foi pinçado com uma pinça hemostática, logo após a última pinça foi removida e o pedículo foi inspecionado para prevenir hemorragias (figura G). Por fim, foi realizada a miorrafia, seguida da redução do espaço morto e sutura da pele.

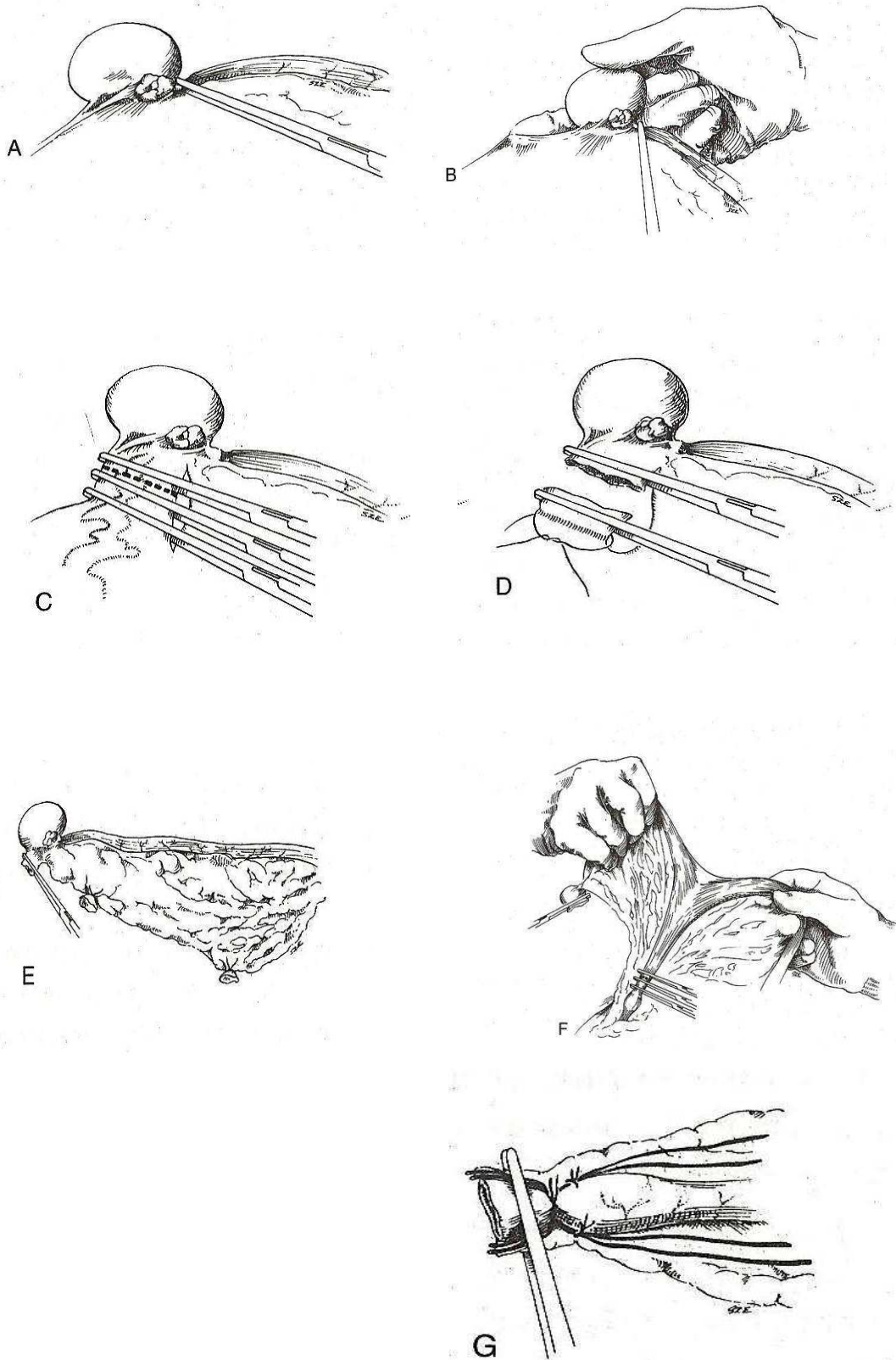


Figura 9 - Técnica utilizada na ovariossalpingoisterectomia. Fonte: STONE, (2007).

3.5 Análises laboratoriais

3.5.1 Citologia vaginal

Após a coleta da amostra, foi realizado um “imprint” de células em uma lâmina devidamente identificada, e em seguida, essa lâmina foi encaminhada para o Laboratório de Reprodução dos Animais Domésticos da Universidade Federal de Campina Grande, corada pelo método Panótico Rápido[®] e analisada, para diagnóstico da fase do ciclo estral.

3.5.2 Cultura microbiológica: vaginal e uterina

Os materiais coletados foram mantidos em meios de transporte Stuart, e encaminhados para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Campina Grande, onde foram semeados por técnica de inoculação em placas de Petri (figura 6) com meios de cultivo Ágar sangue e Ágar MacConkey, e meio de manutenção Brain Infusion Heart (BHI) e incubados em estufa a 37°C durante 24-48 horas. Em seguida, foi observada a presença de crescimento bacteriano, e por meio de uma alça flambada retirou-se parte de cada colônia que cresceu na placa e colocou-se em uma lâmina, logo após, adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio em cada colônia, com o objetivo de avaliar a presença ou ausência de atividade da catalase (teste utilizado para subdividir gêneros: catalase-positivos aeróbios – *Staphylococcus* e *Micrococcus*; catalase-negativos aeróbios – *Streptococcus* e *Enterococcus*), nas reações positivas apareceram bolhas quando o oxigênio foi formado (figura 7). As colônias que cresceram nas placas foram visualizadas em lâminas, com a objetiva de 100X e óleo de imersão, por meio das características morfocolônias e morfotintórias com o auxílio da coloração de Gram, que permite classificar o microrganismo com base na composição da parede celular. Os reagentes utilizados na coloração foram: violeta genciana, lugol, álcool acetona e fucsina.

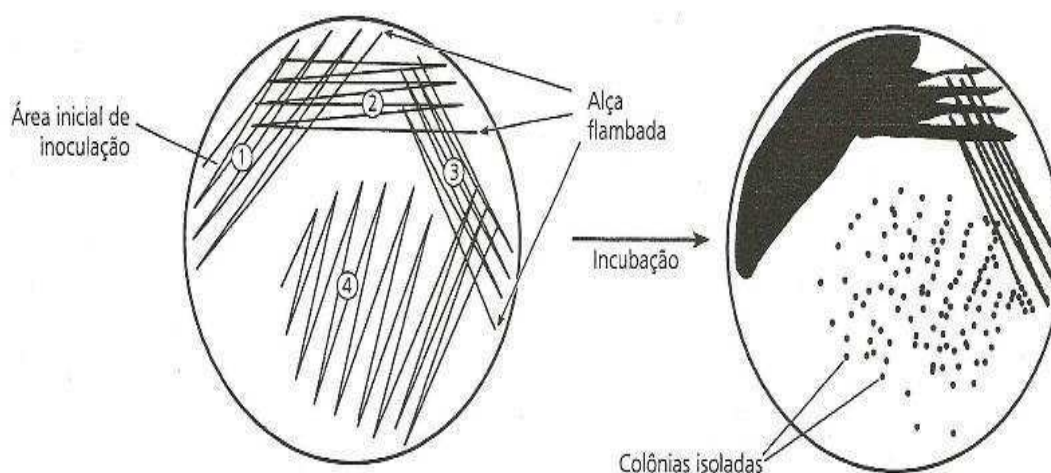


Figura 10 - Técnica de inoculação em placa por esgotamento, para obtenção de colônias isoladas em meio sólido. Fonte: QUINN, (2005).

Na primeira etapa da coloração o material foi submetido à ação da solução de violeta genciana, que corou todas as estruturas presentes. Na segunda etapa, a exposição ao lugol garantiu que as bactérias Gram positivas fixassem a violeta formando um composto, a iodo-para-rosanilina, que resistiu à ação da solução descorante. Por último, para corar as demais estruturas, usou-se a fucsina fenicada de Gram, que conferiu uma coloração vermelha às bactérias Gram negativas.

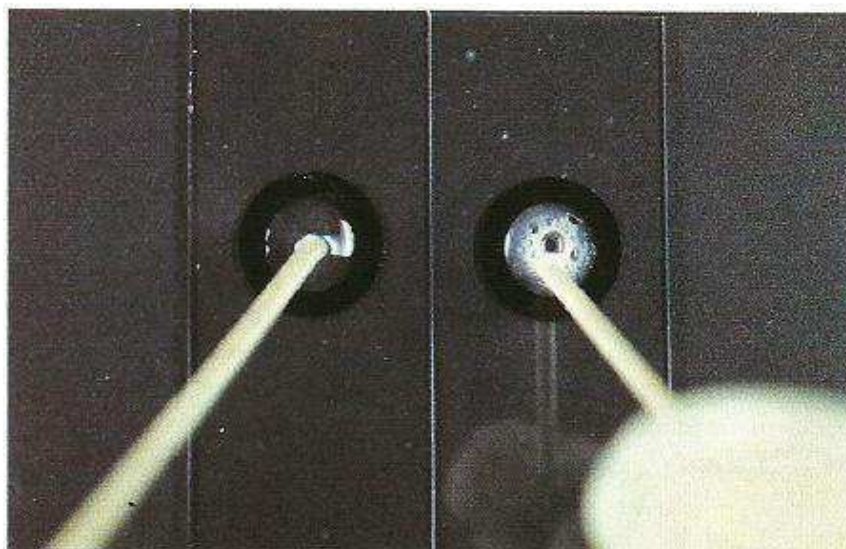


Figura 11 – Teste da catalase. Fonte: MAZA; PEZZLO; BARON, (2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse experimento estão representados nas tabelas 1 e 2. Das treze cadelas utilizadas, seis (45,15%) estavam em anestro, seis (45,15%) estavam em diestro e uma (7,7%) estava em final do proestro para início do estro, conforme os resultados da citologia vaginal (tabela 1).

Tabela 1 – Dados da citologia vaginal de fêmeas caninas em diferentes idades e fases do ciclo estral, submetidas à OSH no HV/CSTR-UFCG.

ANIMAL	IDADE	RAÇA	FASE DO CICLO ESTRAL
Galega	1 ano	SRD	Anestro
Raposa	2 anos	SRD	Final de proestro e início de estro
Marronzinha	2,5 anos	SRD	Anestro
Belinha	5 anos	Poodle	Anestro
Laila	1,5 anos	Pinsher	Diestro
Pintadinha	2 anos	SRD	Anestro
Pretinha	6 meses	SRD	Anestro
Gorducha	3,5 anos	SRD	Diestro
Galega 2	3 anos	SRD	Diestro
Beethova	8 anos	SRD	Diestro
Xuxinha	11 anos	Poodle	Anestro
Paty Gomes	5 anos	Pinsher	Diestro
Totó	12 anos	Teckel	Diestro

Em relação ao isolamento de microorganismos, apenas dois animais (15,38%) apresentaram-se negativos para todo o trato reprodutivo e onze (84,62%) foram positivos para, pelo menos, uma região do trato reprodutivo, estes resultados

corroboram com os estudos de Stein *et al.*, (2009); Avila; Camargo; Benetti e Alarcon, (2008) e Schultheiss; Jones; Kesel e Olson, (1999), que isolaram bactérias do trato reprodutivo na maioria dos animais, assim como o presente estudo.

A vagina cranial foi a região mais colonizada por bactérias, já a cérvix, corpo e cornos uterinos tiveram um baixo índice de contaminação, valendo salientar também que os animais positivos para essas regiões foram os mesmos positivos para a região da vagina cranial.

Devido à impossibilidade de aquisição do material necessário para as análises naquele momento, não foi possível fazer a identificação bioquímica dos agentes isolados, que foram classificados somente como: Bacilos Gram-negativos, Bacilos Gram-positivos, Cocos Gram-positivos e *Staphylococcus*.

A fase do ciclo estral com maior índice de isolamento foi o diestro, este resultado está de acordo com o estudo de Mshelia; Amin e Chaudhary, (2001), que isolaram bactérias da vagina de quarenta e uma cadelas em diferentes fases do ciclo estral na Nigéria, e obtiveram uma taxa de isolamento maior durante o diestro. Igualmente ao estudo realizado por Schultheiss; Jones; Kesel e Olson, (1999) com o objetivo de identificar a flora bacteriana do útero de sessenta e nove cadelas sadias clinicamente e em diferentes fases do ciclo estral, as bactérias isoladas foram: *Staphylococcus* coagulase-negativa, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Streptococcus* beta-hemolítico, no qual fase do ciclo estral com maior porcentagem de isolamento também foi o diestro. Isto ocorre provavelmente por causa da ação da progesterona nessa fase, que devido ao seu efeito imunossupressor e a redução no pH do trato reprodutivo favorece o crescimento bacteriano.

Watts; Wright e Whithear, (1996) realizaram um estudo, no qual foram isolados microrganismos do útero e vagina de cinquenta cadelas normais por canulação uterina transcervical antes e após a morte, este indicou que as fases do ciclo estral com maior índice de isolamento foram o estro e o proestro, diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo (tabela 2). Os autores justificam seus achados devido ao maior acesso das bactérias para o útero pelo relaxamento da cérvix nessas fases, criando melhores condições para o crescimento bacteriano.

Tabela 2 – Tipos de bactérias isoladas em diferentes regiões do trato genital das fêmeas caninas submetidas à OSH no HV/CSTR-UFCG.

ANIMAL	VC*	CER.**	CORP. UT.***	CORNO UT.****
Galega	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Raposa	BGN	Neg.	Neg.	Neg.
Marronzinha	BGP	Neg.	Neg.	Neg.
Belinha	BGN	Neg.	BGN	Neg.
Laila	BGP	Neg.	Neg.	Neg.
Pintadinha	<i>Staphylococcus</i> spp.	Neg.	Neg.	Neg.
Pretinha	BGP	Neg.	Neg.	Neg.
Gorducha	BGN	BGN	Neg.	Neg.
Galega 2	BGP	Neg.	Neg.	CGP
Beethova	BGN	BGN	CGP	Neg.
Xuxinha	BGN	Neg.	Neg.	Neg.
Paty Gomes	BGN	Neg.	Neg.	BGP e CGP
Totó	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

* Vagina Cranial; **Cérvix; ***Corpo Uterino; ****Corno Uterino.

Os resultados do presente estudo reforçam o estudo de Carneiro; Toniollo e Schocken-Iturrino, (2004) que avaliaram a microbiota normal e patogênica da vagina e útero de vinte e oito cadelas (*Canis familiaris*) submetidas à ovariossalpingohisterectomia. Os resultados demonstraram a presença de *Staphylococcus* (76,19%), *Escherichia coli* (66,66%), *Streptococcus* (57,14%), *Lactobacillus* (33,33%), *Sarcina* (28,57%), *Proteus* (14,28), *Pseudomonas* (14,28), *Bacillus* (19,04%), *Corynebacterium* (9,52%), *Streptococcus lacticus* (4,76%) e *Clostridium* (4,76%) nas amostras da vagina de cadelas sadias. Estatisticamente apenas *E. coli*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* tiveram resultados significativos.

Ainda segundo Carneiro; Toniollo e Schocken-Iturrino, (2004), no útero das cadelas sadias os microorganismos isolados foram *Staphylococcus* (42,85%), *E. coli* (23,80%), *Streptococcus* (23,80%), *Lactobacillus* (19,04%), *Streptococcus lacticus* (14,28%), *Bacillus* (9,52%), *Sarcina* (9,52%), *Proteus* (4,76%) e *Corynebacterium*

(4,76%). A maioria dos microorganismos isolados do útero são os mesmos isolados da vagina, reforçando os estudos de Watts; Wright e Whithear, (1996), que também encontraram a microflora uterina semelhante a vaginal.

Em outro estudo realizado por Baba; Furkata e Arakawa, (1983) a microflora aeróbica e anaeróbica em oitenta e duas amostras de vagina e setenta e oito de útero de cadelas adultas em diferentes fases do ciclo estral é constituída mais comumente de *Bacteroides* sp (55%), *Streptococcus* (52%), *Pasteurella* (34%) e *Mycoplasma* (43%), para a mucosa vaginal, sendo os microorganismos em maior número entre os *Streptococcus* o *Streptococcus agalactiae* e o *Streptococcus anginosus*. Das setenta e oito amostras de útero, os microorganismos foram isolados em 48 amostras, sendo os mais frequentes o *Staphylococcus* e *Mycoplasma*. Algumas culturas uterinas tiveram um único agente isolado identificado, ainda que a microflora do útero tenha sido semelhante a da vagina na maioria dos cultivos.

Avila; Camargo; Benetti e Alarcon, (2008) coletaram amostras de mucosa vaginal de setenta fêmeas caninas sem alterações clínicas perceptíveis no sistema genital externo, com a finalidade de determinar as espécies bacterianas presentes no canal vaginal. Das setenta cadelas, cinquenta e oito (82,8%) apresentaram bactérias no canal vaginal, sendo respectivamente *Staphylococcus epidermidis* (14,2%), *Pseudomonas aeruginosa* (11,5%), *Proteus mirabilis* (11,5%), *Staphylococcus aureus* (8,6%), *Escherichia coli* (8,6%), *Proteus vulgaris* (8,6%), *Streptococcus* spp. (5,7%), *Klebsiella* sp. (2,8%), *Shiguella* sp. (2,8%), *Citrobacter* sp. (2,8%), segundo esses autores essas bactérias fazem parte da microflora normal da vagina de cadelas, e alguma alteração no micro ambiente local ou baixa na resistência imunológica do animal, determina quadros patológicos, por essas bactérias serem potencialmente patogênicas.

5 CONCLUSÃO

Nas condições de realização do presente estudo pode-se concluir que:

- Os microorganismos isolados do trato reprodutivo de cadelas foram bacilos Gram-negativos, Bacilos Gram-positivos, Cocos Gram-positivos e *Staphylococcus*;
- A fase do ciclo estral com maior porcentagem de isolamento foi o diestro, provavelmente devido ao efeito imunossupressor da progesterona que se encontra em níveis altos durante essa fase;
- Mais estudos são necessários no sentido de identificar especificamente quais as bactérias que colonizam o trato genital das fêmeas nas diversas fases do ciclo reprodutivo, e associar os resultados à forma de manejo e histórico reprodutivo, o que não foi possível realizar no presente estudo, uma vez que a maioria cadelas utilizadas eram errantes, sem proprietário, impedindo a avaliação das condições de manejo e histórico reprodutivo;

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, I. ; MATHEUS, M.; COSTA, L. L da. Monitorização do ciclo éstrico da cadela para inseminação artificial ou cruzamento. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 2002, Lisboa. **Anais Eletrônicos...** Lisboa: CCV. Disponível em: <<http://horta.0catch.com/congressospcv/20.pdf>> Acesso, 11 mar 2011.
- AVILA, M.O.; CAMARGO, L.M.; BENETTI, A.H.; ALARCON, L.F. Microbiota da mucosa vaginal de fêmeas caninas saudáveis atendidas no hospital veterinário da Universidade de Cuiabá, MT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35, 2008, Gramado. **Anais eletrônicos...** Gramado: CONBRAVET, 2008. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0632-1.pdf>>. Acesso em: 24 set 2009.
- BABA, E. H.; FURKATA T.; ARAKAWA A. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, p.606, 1983.
- BAKER, R.; LUMSDEN, J. H. Reproductive tract. In: BAKER, R. H.; LUMSDEN, J. H. **Color Atlas of Citology of the Dog and Cat**. CV Mosby: St. Louis, 1999, p. 235-251.
- BEZERRA, F.C; PINA, V.M.L. Diagnóstico das fases do ciclo estral através de citologia vaginal em cadelas apreendidas pelo Centro de Vigilância Ambiental da Cidade do Recife-PE. **Revista CFMV**, n. 37, 2004.
- CARNEIRO, A.P.; TONIOLLO G. H.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Avaliação microbiológica da flora vaginal e do corpo uterino de cadelas (*Canis familiares*) submetidas à Ovariossalpingohisterectomia. **ARS Veterinária: Revista da Medicina Veterinária e Zootecnia**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, v. 21, n. 3, p. 361-367, jul-set 2005.
- CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2004. Cap 36, p 402.

Escherichia coli. Disponível em:<www.pilotspoint.net> Acesso em: 31maio2011.

FELDMAN, E. C. O complexo hiperplasia endometrial cística/ piometra e infertilidade em cadelas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do cão e do gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2004. 2v. Cap 162, p. 1632.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: _____. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. p. 529-546.

HENSON, K. L. Sistema Reprodutor. In: RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Atlas de Citologia de cães e gatos**. Tradução José Jurandir Fagliari. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 11, p. 243-244.

HIRSH, D. C. O Trato Genital como um Hábitat Microbiano. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 35, p.179.

JOHNSON, C. A. Distúrbios do Ciclo Estral. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1994. Cap. 55, p. 465-480.

JOHNSON, C. A. Distúrbios do Ciclo Estral. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap. 56, p.811-814.

KUSTRITZ, M. V. R. Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 567-574, 2006.

MAZA, L.M. de la; PEZZLO, M.T.; BARON, E.J. **Atlas de diagnóstico em microbiologia**. Tradução José Procópio Moreno Senna. Porto Alegre: Artmed, 2001. Cap. 5, p. 33.

McDONALD, L. E. **Veterinary endocrinology and reproduction**. 4th. Ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1989.

MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**. 2th. Ed., WB Saunders, Philadelphia, 1986.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. Tradução Claudia Adelino Espanha [et al.] - Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

MUSOLINO, C.; GHIRELLI, C. de O. ; MORENO, L. M. Alterações do Ciclo Estral em Cadelas. USP- São Paulo 2000. Disponível em <
<http://www.redevet.com.br/artigos/cicloes2.htm>> Acesso, 25 fev 2011.

OLIVEIRA, E.C.S.; MARQUES JÚNIOR, A. P.; NEVES, M. M. Endocrinologia Reprodutiva e Controle da Fertilidade da Cadela – Revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2003.

OLSON *et al.* Vaginal cytology: Part. I. A useful tool for staging the canine estrous cycle. **Compend. Contin. Educ. Pract.**, v.6, p. 288-297, 1984.

PERKINS, J. Endocrine Physiology. In: HANSEN, J. T.; KOEPPEN, B.M. **Netter's atlas human physiology**. WB Saunders, 2002. Cap 8, p. 207.

QUINN *et. al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Tradução: Lúcia Helena Niederauer Weiss e Rita Denise Niederauer Weiss. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RAPOSO, R.S.; SILVA, L.D.M. Comparação qualitativa de diferentes técnicas de coloração para a citologia vaginal de cabras da raça Saanen. **Ciência Animal**. v. 9, p.85-87, 1999.

REECE, W. O. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. Tradução Nelson Penteadó Júnior. São Paulo: Roca, 1996. Cap. 12, p. 297.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Endocrinologia reprodutiva na cadela. **Clínica Veterinária**. v.40, p. 50-58, 2002.

SCHAEFERS-OKKENS, A.C. Ciclo estral e Manejo Reprodutivo da cadela sadia. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do cão e do gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2004. 2v. Cap. 157.

SCHULTHEISS, P. C.; JONES, R. L.; KESEL, M. L.; OLSON, P. N. Normal bacterial flora in canine and feline uteri. **Journal of veterinary diagnostic investigation**. v. 11, p. 560-562, 1999.

STONE, E.A. Ovário e útero. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3 ed. Barueri: Manole, 2007. Cap. 98, p. 1497.

SILVA, D. C. V. da ; CAMPOS, L. C. *Escherichia coli* que Causa Infecções Extra-intestinais. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 41, p. 311.

SOUZA, C. A. I.; SCARCELLI, E. Agressão por microrganismos da microbiota endógena. **Arquivos Instituto Biológico**, v.67, n.2, p.275-281, jul./dez, 2000.

SPICER, W. J. **Bacteriologia, Micologia e Parasitologia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 29.

STEIN, M. *et al.* Avaliação da microbiota vaginal de fêmeas caninas relacionadas com o ciclo estral. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18, 2009, Pelotas. **Anais eletrônicos...** Pelotas: CIC, 2009. Disponível em <
http://www.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA_01749.pdf> Acesso em: 14 abr 2011.

STONE, E. A. Ovário e útero. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3 ed. Barueri: Manole, 2007. 2 v. Cap. 98, p. 1496-1498.

TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L. C.; TRABULSI, L. R. Streptococcus, Enterococcus e Gêneros Relacionados. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 22, p. 189-193.

THRALL, M. A.; OLSON, P. N. The Vagina. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. M. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat**. CV Mosby: St. Louis, 1999. p. 240-248.

VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. dos. Técnica de Citologia Vaginal como método de diagnóstico da fase do ciclo estral em cadelas. **Clínica Veterinária**. n 9, p. 18, jul/ago, 1997.

WATTS, J. R.; WRIGHT, P. J.; WHITHEAR, K. C. Uterine and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. **Journal of Small Animal Practice**, v.37, p.7, 1996.

WRIGHT, P.J.; PARRY, B.W.; Cytology of the Canine Reproductive System. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 19, p. 862-869, 1989.