

# Interés de las biopsias de útero como método diagnóstico de la infertilidad de origen inexplicado en la perra

## Value of surgical uterine biopsies for the diagnosis of infertility in the bitch

F. Mir,<sup>1</sup> E. Fontaine,<sup>1</sup> M. Greer,<sup>2</sup> F. Vannier,<sup>1</sup> A. Fontbonne.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CERCA, École Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort, Paris, France; <sup>2</sup>Veterinary Village, ICSB-Wisconsin, USA

### Resumen

Las lesiones uterinas están consideradas como una de las causas principales de la infertilidad canina. Sin embargo, hasta el momento, escasas publicaciones han evaluado su verdadero impacto en la perra. En este estudio se describen los resultados histológicos de 20 perras con infertilidad de origen indeterminado a las que se les practicó una biopsia uterina por laparotomía durante el periodo de diestro, en el 75% de los casos. Se definieron 3 grupos: perras cuya gestación nunca fue confirmada (GNC), perras con interrupción de la gestación (IG) y perras con subfertilidad. En total, el 89.5% de las biopsias fueron anormales. Las patologías más frecuentemente diagnosticadas fueron la endometritis (31.5%), la HGQ (Hiperplasia Glándulo-Quística) (31.5%) y la FDG (fibrosis asociada a la degeneración de las glándulas endometriales), (21%), que pudieron encontrarse aisladas o asociadas a otras anomalías. En ninguno de los casos se aisló un agente infeccioso. Mientras que la HGQ y la FDG probablemente jueguen un papel importante en la infertilidad, las endometritis podrían ser, en ciertos casos la causa primaria, y en otros, la consecuencia de la interrupción precoz de la gestación.



**Palabras clave:** Infertilidad, biopsia uterina, endometritis, hiperplasia glándulo-quística, fibrosis endometrial.  
**Keywords:** Infertility, uterine biopsy, endometritis, cystic endometrial hyperplasia, endometrial fibrosis.

*Clin. Vet. Peq. Anim*, 2011, 31 (1): 35-39

## Introducción

Se considera que una perra es infértil cuando es incapaz de producir una camada tras dos tentativas de reproducción. La determinación incorrecta del periodo fértil es, de lejos, la principal razón conocida de infertilidad en la perra. La infertilidad del macho es la segunda causa de falta de concepción.<sup>1</sup> Tras descartar estas dos grandes posibilidades, aún queda por explicar buena parte de la fisiopatología de la infertilidad, lo que convierte su diagnóstico en un auténtico reto para el clínico.

Las lesiones uterinas están consideradas como una de las principales causas de infertilidad en la perra, tanto por su capacidad para modificar el medio uterino e impedir la concepción, como por imposibilitar la nidación o el correcto desarrollo embrionario o fetal.<sup>1</sup> Pueden ser de tipo inflamatorio, hiperplásico o tumoral<sup>2</sup> existiendo en la mujer, la vaca y la yegua numerosas referencias sobre el impacto en la fertilidad de la endometritis, la endometriosis, la fibrosis uterina o la atrofia/hipoplasia de las glándulas endometriales.<sup>3-6</sup> La real importancia en la fertilidad de la perra ha sido muy poco documentada hasta la fecha, pese a que ya se han descrito técnicas de obtención de biopsias tanto por laparotomía<sup>7</sup> como por vía transcervical.<sup>8</sup> El objetivo de este estudio es investigar el interés de la práctica de biopsias uterinas quirúrgicas en perras con infertilidad inexplicada.

## Material y métodos

Se incluyeron 20 perras de una edad media de 4.7 años (rango: 2-8 años). Nueve de ellas fueron atendidas en el CERCA (*Centre d'Études en Reproduction des Carnivores*) del ENVA (*École Nationale de Maisons-Alfort*) durante los años 2008 y 2009, mientras que el resto (11/20 casos) acudieron a otro centro de reproducción asistida (International Canine Semen Bank, Wisconsin, USA) entre el 2000 y el 2008. Todas fueron incluidas tras al menos dos episodios de infertilidad inexplicada: las montas o inseminaciones (intravaginales o intrauterinas) tuvieron lugar entre 1 y 3 días postovulación, previamente determinada mediante mediciones cuantitativas de la tasa de progesterona sanguínea (quimioluminiscencia-Elecsys 2010-Roche Diagnostics-Alemania). Se realizó un diagnóstico ecográfico de gestación a partir de 23 días postovulación.

- En los casos en los que no se confirmó una gestación en ningún momento, se excluyó cualquier anomalía ecográfica del útero y los ovarios.

- Al resultar gestante la perra, se cuantificó el número aproximado de embriones y su localización en la luz uterina.

- Ante una interrupción de la gestación, se registró la fecha de detección de reabsorciones embrionarias o de aborto tardío.

En todos los casos de infertilidad se excluyó la brucelosis canina, mediante un examen serológico; así como una insuficiencia luteal mediante una medición cuantitativa de la progesterona sanguínea.

\* Contacto: fmir@vet-alfort.fr

Siempre que fue posible (15/20 casos), la biopsia se practicó durante el periodo de diestro, lo más cerca posible del diagnóstico de infertilidad, con el objetivo de coincidir con el periodo de inmunosupresión intrauterina y maximizar las posibilidades de identificar un agente infeccioso.

### Clasificación de la infertilidad por grupos

Según el momento del diagnóstico de la infertilidad se diferenciaron dos grupos. Además, se incluyó un grupo altamente sospechoso de subfertilidad.

**Gestación no confirmada (GNC):** perras para las que el diagnóstico precoz de gestación fue negativo (13/20 casos). Tres de ellas habían tenido al menos una camada con anterioridad, mientras que el resto nunca habían quedado preñadas antes. Una de estas últimas sufrió una piometra 1.5 años atrás, que se trató médicamente con éxito.

**Interrupción de la gestación (IG):** Reabsorciones embrionarias o fetales visualizadas por ecografía (3/20 casos) y aborto tardío, con expulsión de fetos (2/20 casos). Todas ellas, excepto una, eran perras multíparas que, al menos durante la última gestación, habían padecido los síntomas por los que fueron incluidas en este estudio. También se incluyó una Dogo Canario multípara para el que era su primer episodio de reabsorción embrionaria total.

**Subfertilidad** (2/20 casos): perras sin interrupción de la gestación pero con un número anormalmente reducido de cachorros. Una de ellas sufrió una piometra el celo precedente.

### Procedimiento quirúrgico

Tras una laparotomía exploratoria bajo anestesia general, fueron examinados el útero (primero por inspección visual y luego por palpación del cuerpo), los cuernos uterinos, el oviducto y los ovarios. En los casos en los que el útero presentó una lesión sospechosa, se practicó una incisión longitudinal en media luna de 1 cm con un bisturí del nº10, abarcando todo el grosor de la pared uterina. En los casos donde el examen macroscópico no reveló ninguna anomalía (Fig. 1) el mismo método de biopsia fue realizado en medio de cada uno de los cuernos uterinos. Se controló la hemostasia y se suturó la incisión mediante un punto en X con un hilo trenzado y reabsorbible de 3-0 (Polysorb, Lactomer, Synature).

Para minimizar el riesgo de piometra, los casos atendidos en Francia recibieron una inyección de aglepristona (Alyzine®, 10mg/kg, SC) al finalizar la intervención y otra una semana más tarde. En Estados Unidos, las perras operadas a



**Figura 1.** Incisión longitudinal en la zona media del cuerno uterino. Imagen cedida por CERCA.

mitad del diestro fueron tratadas con prostaglandinas F2 $\alpha$  (Lutalyse®, dinoprost, 150 $\mu$ g/kg/día, SC) durante 5 días.

Se realizó un control ecográfico del útero una vez por semana durante dos semanas.

### Búsqueda de agentes infecciosos

Se introdujeron dos hisopos estériles en la luz uterina. Uno de ellos fue destinado al cultivo e identificación de bacterias aerobias, mientras que el otro, se utilizó para la búsqueda de otros agentes infecciosos: *Mycoplasma* y *Ureaplasma* (cultivo o PCR), Herpesvirus canino (CHV) y Parvovirus tipo 1 (CPV-1) por PCR.

### Preparación e interpretación de las muestras histológica

Las muestras fueron fijadas en una solución tampón de formol al 10% durante al menos 48 horas, para ser posteriormente procesadas de forma rutinaria. Tras su inclusión en parafina, se realizaron secciones de 4  $\mu$ m que se tiñeron con hematoxilina-eosina-safran (HES).

Durante la interpretación histológica las lesiones fueron clasificadas como "discretas", "moderadas" o "importantes" según su grado de intensidad.

## Resultados

### Inspección y palpación

El útero y los ovarios de las perras pertenecientes al grupo GNC fueron macroscópicamente normales en el 61.5% de los casos, mientras que en el 30.7% existía una distensión moderada debido a un contenido de consistencia líquida y, en el 15.3%, se observaron quistes en la serosa uterina. En uno de los casos existía un quiste seroso asociado a una dilatación uterina moderada.

Dentro del grupo con IG, las perras en las que se detectó una reabsorción de todas las vesículas embrionarias presentaron una distensión de los cuernos uterinos con un contenido sero-mucoso. En los casos de aborto tardío el útero estaba dilatado, con un contenido de consistencia mucosa y color marrón, asociado a la presencia de restos placentarios y fetales en descomposición.

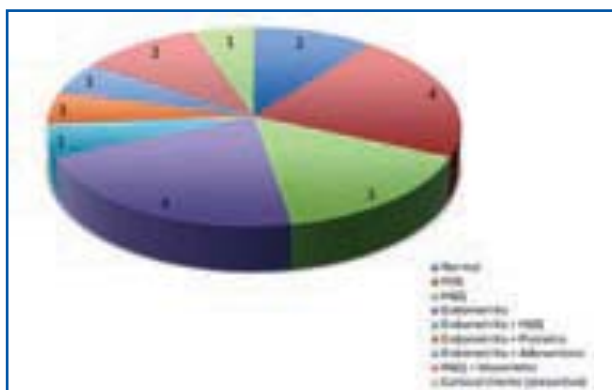
En una de las hembras subfértiles se practicó la biopsia durante una cesárea programada en su única gestación. Tanto el útero como su único cachorro presentaban un aspecto normal. El útero de la otra perra fue biopsiado en anestro, sin presentar ninguna anomalía externa.

### Resultados histopatológicos

El 89.5% de las biopsias uterinas (17/19 casos) reveló algún tipo de anomalía. Además, en un caso perteneciente al grupo GNC, no se llegó a ninguna conclusión porque el tejido endometrial fue insuficiente para establecer un diagnóstico.

Las lesiones más frecuentemente encontradas fueron la fibrosis asociada a la degeneración de las glándulas endometriales (FDG), las endometritis y la Hiperplasia Glándulo-Quística de carácter moderado (HGQ). Los resultados globales se encuentran resumidos en la Fig. 2.

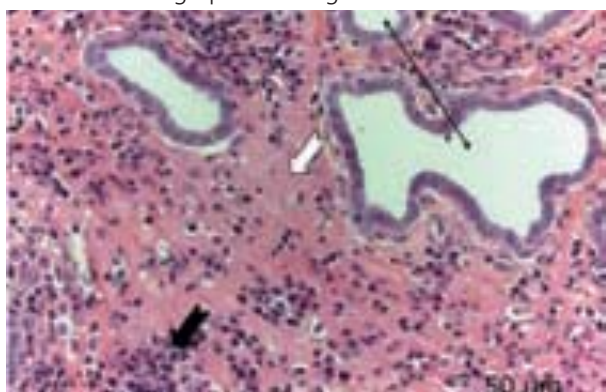
Se diagnosticó algún tipo de anomalía endometrial en el 91% de las perras del grupo GNC (11/12 casos). La



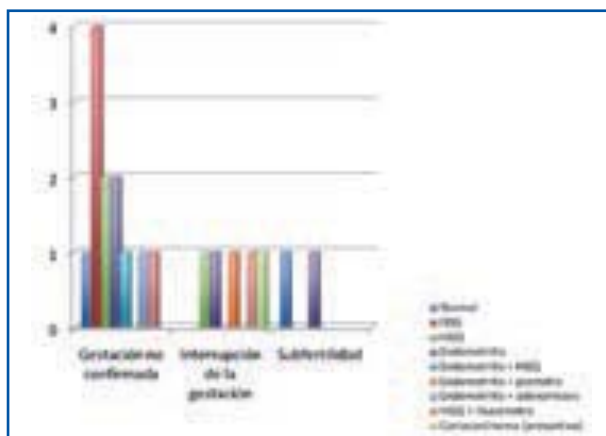
**Figura 2.** Diagrama global de los resultados histopatológicos uterinos.

FDG era discreta en 2/4 casos, mientras que en las otras dos, era de carácter moderado en una e importante en la otra. Uno de los casos de HGQ aislada se clasificó como importante, mientras que el resto fueron lesiones discretas. Las endometritis aisladas eran moderadas mientras que las que se presentaron asociadas a otras lesiones eran de carácter discreto (Fig. 3).

Todas las perras del grupo IG presentaron alguna lesión de carácter moderado. Los resultados están expuestos junto con los otros grupos en la Fig. 4.

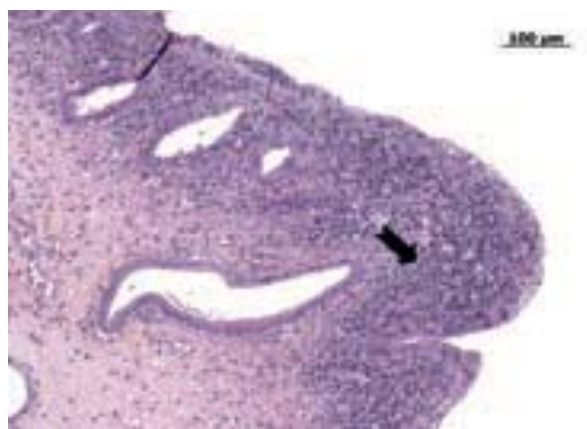


**Figura 3.** Fotomicrografía de una endometritis linfoplasmocitaria (flecha negra grande) asociada a una HGQ discreta (dilatación de las glándulas endometriales, flecha negra fina) con edema (flecha blanca fina) y fibrosis (fibras de colágeno, flecha blanca grande). HES; x200. Imagen cedida por el Departamento de Anatomía Patológica, ENVA.



**Figura 4.** Diagrama dividido por grupos de los resultados histopatológicos uterinos.

La perra subfétil biopsiada en anestro presentó una endometritis linfo-plasmocitaria (Fig. 5) y neutrofílica, mientras que la biopsia practicada al mismo tiempo que la cesárea en la perra con un único cachorro y que con anterioridad había padecido una piometra no reveló ninguna anomalía.



**Figura 5.** Fotomicrografía de una endometritis linfoplasmocitaria (flecha) en una perra con resorciones embrionarias. HES; x100. Imagen cedida por el Departamento de Anatomía Patológica, ENVA.

### Agentes infecciosos

En ninguno de los casos se detectó la presencia de algún germen, tanto en los cultivos bacteriológicos como en los virus investigados por PCR.

### Postoperatorio

En ningún caso se observó complicación alguna (hematometra, piometra...) durante las dos semanas tras la biopsia uterina. Sin embargo, en uno de los casos se detectó una estenosis uterina secundaria a la biopsia durante el seguimiento del siguiente celo (Fig. 6).



**Figura 6.** Estenosis uterina secundaria a una biopsia de útero. Imagen cedida por CERCA.

### Discusión

Este es el primer estudio histopatológico uterino realizado en perras infértiles y/o subfértiles. En un estudio citológico previo a partir de un lavado uterino realizado por vía trans-

cervical,<sup>9</sup> el 38% de las perras con infertilidad de origen indeterminado incluidas bajo las mismas condiciones que nuestro grupo GNC padecían una endometritis, siendo de origen bacteriano en un 70% de éstas. Bajo los mismos criterios de inclusión, en nuestro actual estudio diagnosticamos un 30% de endometritis, estando asociada a una HGQ en un caso y a una adenomiosis moderada en otro; mientras que en otro 30% se detectó una HGQ que, al impedir la nidación o reducir el aporte sanguíneo al embrión, fue casi con toda seguridad la causa de infertilidad. En los casos en que ambas lesiones estuvieron asociadas, la endometritis pudo ser únicamente la consecuencia de una resorción precoz provocada por la HGQ,<sup>10</sup> o que ésta última haya favorecido el desarrollo de una inflamación del mismo modo en que clásicamente se sospecha que puede predisponer al desarrollo de una piometra.<sup>1</sup> Estas lesiones también podrían ser independientes<sup>11</sup> o incluso descubrimientos fortuitos, como posiblemente lo sea la adenomiosis. Además, se diagnosticó una FDG moderada en 4 perras nulíparas pese a repetidas inseminaciones intrauterinas con semen fresco de sementales confirmados y que, aparentemente, no habían padecido ninguna patología uterina. Puesto que esta lesión puede ser la secuela de una inflamación previa, existe la posibilidad de que estas perras hayan sufrido una endometritis anteriormente. Como sucede con la HGQ, se desconoce a partir del grado en que la FDG puede explicar la infertilidad, ya que es difícil imaginar que el útero necesite estar completamente exento de estas lesiones para que la gestación llegue a término.

Todos los casos del grupo IG presentaron algún tipo de anormalidad endometrial. La perra con el primer episodio de reabsorción de todos los embriones presentó una endometritis linfoplasmocitaria aislada. Estas lesiones (Fig. 5) pueden ser explicadas del mismo modo que en el grupo GNC, sin que podamos concluir sobre su verdadero papel en la infertilidad. Una vez más, los dos casos de HGQ (uno de ellos asociado a evidencias histológicas de mucometra), fueron muy probablemente el origen de la interrupción de la gestación. El diagnóstico presuntivo de coriocarcinoma también merece una mención especial. Pese a que el aspecto histológico fue altamente sugestivo, este tumor es muy inhabitual en la perra (ningún caso descrito a nuestro

conocer); sin embargo, su aspecto puede ser muy similar al de una HGQ<sup>12</sup> y el único modo de establecer un diagnóstico definitivo es mediante tinción inmunohistoquímica, que no se practicó por motivos económicos.

El 75% de las biopsias fueron realizadas durante el periodo de diestro para coincidir tanto con el periodo de inmunosupresión intrauterina como de inmunodepresión de la perra.<sup>13</sup> No se aisló ningún patógeno ni en los casos en los que se diagnosticó una endometritis y, durante el examen microscópico, tampoco se visualizaron bacterias intracitoplasmáticas ni cuerpos de inclusión viral. Tanto puede ser que se trate de agentes infecciosos capaces de provocar la reacción inflamatoria, pero que hayan desaparecido al realizar la biopsia, como gérmenes anaerobios que no hayan podido proliferar en nuestros medios de cultivo u otros virus diferentes a los que hemos buscado por PCR. Además, también deberían formularse otras hipótesis para explicar la infiltración linfoplasmocitaria, tales como un proceso autoinmune, una reacción de hipersensibilidad al semen como en la mujer<sup>14</sup> o un retraso en el drenaje del líquido intrauterino acumulado durante el celo por un mecanismo similar al observado en la yegua.<sup>4</sup>

Las biopsias uterinas por laparotomía parecen un método prometedor y preciso de diagnóstico de infertilidad de origen inexplicado en la perra. En comparación con la biopsia transcervical,<sup>8</sup> la laparotomía permite la inspección externa del útero y ovarios, posibilitando la detección y biopsia de lesiones específicas. Además, no es posible contaminar la muestra bacteriológica a su paso por la vagina y el riesgo de hematometra es mínimo. La HGQ moderada y la FDG probablemente jueguen un papel importante en la infertilidad, mientras que la endometritis parece ser, para ciertos casos, la causa primaria; y para otros, la consecuencia de la interrupción precoz de la gestación por otra causa, que no siempre se ha conseguido determinar.

## Agradecimientos

Los autores agradecen la cesión de imágenes al Departamento de Anatomía Patológica del ENVA, así como la colaboración del Departamento de Microbiología de este mismo centro por su colaboración en este estudio.

## Summary

Uterine lesions are considered to be one of the main causes of canine infertility. However, few publications have evaluated their real impact in the bitch. Uterine histological results of 20 bitches with unexplained infertility are exposed in this study. A surgical biopsy was performed by coeliotomy in all of them, during the luteal phase in 75% of the cases. Three groups were defined: bitches whose pregnancy was never confirmed (NCP), bitches with pregnancy arrest (PA) and hypofertile bitches. Overall, 89.5% of the biopsies were abnormal. Most frequently found lesions were endometritis (31.5%), CEH (Cystic Endometrial Hyperplasia) (31.5%) and FDG (fibrosis with degeneration of the endometrial glands) (21%). These lesions were diagnosed isolated or associated with other abnormalities. Any infectious agent was not isolated in none of the cases. CEH and FDG might play an important role in infertility, while endometritis might be the primary cause for some of the cases and a consequence of the pregnancy arrest for others.

## Bibliografia

1. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. Disorders of the canine uterus and uterine tubes (Oviducts), 206-224. Clinical approach to infertility in the bitch. *En: Canine and Feline Theriogenology* (1<sup>st</sup> Ed), Philadelphia, WB Saunders, 2001, 257-273.
2. Gerber D, Nöthling JO: Hysteroscopy in bitches. *J Reprod Fertil Suppl*, 2001; 57:415-417.
3. De Ziegler D, Borghese B, Chapron C: Endometriosis and infertility: pathophysiology and Management. *Lancet* 2010; 376:730-738.
4. Le Blanc MM, Causey RC: Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility. *Reprod Dom Anim* 2009;44(Suppl. 3), 10-22.
5. Schlafer DH: Equine endometrial biopsy: Enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques?. *Theriogenology* 2007;68:413-422.
6. Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE: Mechanism of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod Dom Anim* 2009;44(Suppl. 3):1-9.
7. Downs M, Miller-Liebl D, Fayrer-Hosken R, Caudle A: Obtaining a useful uterine biopsy specimen in dogs. *Vet Med*, 1994;89:1055-1059.
8. Günzel-Apel AR, Wilke M, Aupperle H, Schoon HA: Development of a technique for transcervical Collection of uterine tissue in bitches. *J Reprod Fertil (Suppl)*, 2001;57:61-65.
9. Fontaine E, Levy X, Grellet A, et al: Diagnosis of Endometritis in the Bitch: A New Approach. *Reprod Dom Anim* 2009; 44 (Suppl. 2): 196-199.
10. Schlafer DH, Miller RB: Abortion and stillbirth. *En: Pathology of domestic animals*. Jubb, Kennedy & Palmer's (5<sup>th</sup> Ed), Philadelphia WB Saunders, 2001, 481-537.
11. De Bosschere H, Ducatelle R, Vermeirsch H, Van Den Broeck W, Coryn M: Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected?. *Theriogenology* 2001; 55:1509-19.
12. Schlafer DH, Miller RB: Pathology of the cervix, vagina and vulva. *En: Pathology of domestic animals*. Jubb, Kennedy & Palmer's (5<sup>th</sup> Ed), Philadelphia WB Saunders, 2001, 545-550.
13. Sugiura K, Nishikawa M, Ishiguro K, et al. Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology* 2004;209:619-27.
14. Tomitaka A, Suzuki K, Akamatsu H, Matsunaga K: Anaphylaxis to human seminal plasma. *Allergy* 2002;57:1081-1082.