

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**DETERMINAÇÃO DAS INTERLEUCINAS IL6 E
IL12 NO ENDOMÉTRIO EX VIVO CANINO SOB A
INFLUÊNCIA DE LIPOPOLISSACARÍDEOS E
HORMÔNIOS ESTERÓIDES**

Meire Ellen Mendes Silva

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MG – BRASIL

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**DETERMINAÇÃO DAS INTERLEUCINAS IL-6 E IL-
12 NO ENDOMÉTRIO EX VIVO CANINO SOB A
INFLUÊNCIA DE LIPOPOLISSACARÍDEOS E
HORMÔNIOS ESTERÓIDES**

Meire Ellen Mendes Silva

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – UFU, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica e Investigação Etiológica

UBERLÂNDIA – MG – BRASIL

Outubro - 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586d
2016 Silva, Meire Ellen Mendes, 1987
 Determinação das interleucinas IL-6 e IL-12 no endométrio ex vivo
 canino sob a influência de lipopolissacarídeos e hormônios esteróides /
 Meire Ellen Mendes Silva. - 2016.
 43 f. : il.

 Orientador: João Paulo Elsen Saut .
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 Inclui bibliografia.

 1. Veterinária - Teses. 2. Progesterona - Teses. 3. Endométrio -
 Doenças - Teses. 4. Cão - Doenças - Teses. I. Saut, João Paulo Elsen.
 II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
 Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Meire Ellen Mendes Silva - nascida na cidade de Monte Alegre de Minas, Estado de Minas Gerais aos seis dias do mês de agosto de um mil novecentos e oitenta e sete. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no segundo semestre de 2007, tendo concluído o curso em julho de 2012. Em dezembro de 2013 foi aprovada no processo seletivo de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (Mestrado) da UFU para ingresso em março de 2014.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e faça tudo sempre com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá. ”

(Ayrton Senna)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar a vida, e por me dar força para ser e melhorar o que sou. Aos meus anjos da guarda, meu pai Sebastião, meus avós Antônio e Maria, por me guiarem por este caminho, por toda proteção, sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu orientador Prof.Dr.João Paulo que desde o início sempre incentivou e acreditou em meu trabalho, por quem tenho grande respeito e admiração.

Aos meus pais, Sandra e Márcio por todo o incentivo, amor, carinho e dedicação, por serem meus alicerces. Aos meus irmãos Tukinha e João Antônio, por estarem sempre me apoiando e me fazendo rir mesmo quando as coisas estavam difíceis.

Aos meus sogros, Válbia e Kléber, por todo incentivo, por serem um exemplo de amor, união, honestidade e respeito, e por me acolherem como filha me dando amor e carinho.

Aos meus amigos de todos os dias Paula Batista, Amanda, Rafaela, Thaísa e Pablo pela contribuição especial neste trabalho e por serem pessoas tão especiais.

As minhas queridas amigas Solange e Polly por todo carinho, incentivo, confiança, conselhos, paciência e amor a mim dedicados.

Aos animais que fizeram parte desde trabalho, sem eles nada disso seria possível.

Aos meus animais Raika, Shiryu e Shaman pela amizade verdadeira, pela inspiração, e por me mostrarem que palavras são insignificantes diante de um olhar sincero, e que temos muito que aprender com os animais.

Ao meu grande amor, Renan, obrigado pelo carinho, pela força, pelo amor verdadeiro, pela sinceridade, pela paciência, pelo companheirismo, por enxugar minhas lágrimas nos meus momentos mais tristes, e por compartilhar momentos intensos de felicidade, por ser meu tudo durante todos esses anos.

E ao meu novo grande amor Anthony, que é o melhor presente que Deus me deu, que fez despertar em mim sentimentos que eu jamais imaginaria vivenciar, estamos ansiosos por sua chegada.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Explantes de endométrio intactos acumulam IL-6 e IL-12 em resposta a lipopolissacarídeos com 12 e 24 horas de exposição	29
Figura 2: Resposta de explantes de endométrio intactos a lipopolissacarídeos e a influência dos estágios do ciclo estral.	30
Figura 3: Hormônios esteroides exógenos (estradiol e progesterona) e dexametasona regulam a resposta de IL 6 e IL12 na presença de lipopolissacarídeos.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Ciclo Estral da Cadela	14
2.1.1 Proestro	14
2.1.2 Estro	15
2.1.3 Diestro	16
2.1.4 Anestro	17
2.2 Imunidade Uterina	18
2.3 Piometra	20
2.4 Explantes Endometriais	21
3 METODOLOGIA	23
3.1 Animais e local de execução	23
3.2 Delineamento experimental	23
3.3 Dosagem de progesterona	24
3.4 Processamento das Amostras	24
3.4.1 Primeiro experimento - processamento dos explantes	24
3.4.2 Segundo experimento	25
3.4.2.1 Determinar a resposta imune do endométrio canino ex vivo a lipopolissacarídeos experimento	25
3.4.2.2 Avaliar a influência do ciclo estral na resposta imune uterina a lipopolissacarídeos	25
3.4.2.3 Avaliar a influência da progesterona, estradiol e dexametasona na resposta imune inata uterina a lipopolissacarídeos	25
3.5 Técnica de ELISA para determinação das citocinas	26
3.6 Análise Estatística	26
4 RESULTADOS	28
4.1 Considerações gerais	28

4.2 Resposta imune inata do endométrio canino <i>ex vivo</i> em diferentes tempos de exposição e concentrações de lipopolissacarídeos	28
4.3 Influência do ciclo estral na resposta imune uterina a lipopolissacarídeos	29
4.5 Influência dos hormônios esteroides ovarianos na resposta imune inata a lipopolissacarídeos	30
5 DISCUSSÃO	32
5.1 Uso de explantes endometriais como modelos experimentais <i>ex vivo</i> no estudo da imunidade inata em cadelas	32
5.2 Efeito do ciclo estral na resposta imune inata uterina em cadelas	35
6 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38

DETERMINAÇÃO DAS INTERLEUCINAS IL-6 E IL-12 NO ENDOMÉTRIO EX VIVO CANINO SOB A INFLUÊNCIA DE LIPOPOLISSACARÍDEOS E HORMÔNIOS ESTERÓIDES

RESUMO – Infecções bacterianas uterinas, como a piometra, são mais comuns na fase do diestro de cadelas, período em que há predomínio do hormônio progesterona, o qual promove o acúmulo de secreção endometrial no lúmen uterino e, conseqüentemente, favorece um ambiente favorável para o crescimento bacteriano. Os níveis de progesterona endógena ou exógena são uma das possíveis causas do desenvolvimento da piometra. Os objetivos deste trabalho foram de determinar a resposta imune inata do endométrio canino *ex vivo* a lipopolissacarídeos e a influência do ciclo estral e dos hormônios esteroides progesterona, estradiol e dexametasona na resposta imune inata uterina a lipopolissacarídeos. Para tanto foram utilizados explantes endometriais colhidos de 37 cadelas saudáveis, adultas e de raças variadas submetidas à ovariectomia (OSH) eletiva. Neste estudo, foi possível estabelecer a técnica de explantes endometriais em cadelas como um modelo experimental viável para aprofundar o entendimento da resposta imune inata uterina. Concluiu-se que não houve efeito do estágio do ciclo estral na resposta das citocinas ao estímulo de lipopolissacarídeos. A adição de progesterona e estradiol previamente ao desafio por lipopolissacarídeos estimula a resposta da interleucina pró-inflamatória IL12. A adição de dexametasona previamente ao desafio por lipopolissacarídeos reduz a resposta da interleucina pró-inflamatória IL6 e estimula a interleucina pró-inflamatória IL12.

Palavras-Chave: estradiol, progesterona, ciclo estral, dexametasona, interleucinas

DETERMINATION OF IL-6 AND IL-12 INTERLEUKINS IN THE EX VIVO CANINE ENDOMETRIAL UNDER THE INFLUENCE OF LIPOPOLYSACCHARIDES AND HORMONES STEROIDS

ABSTRACT – Uterine bacterial infections in bitches as pyometra, are more common in the diestrous phase, during which there is a predominance of the hormone progesterone, which promotes the accumulation of endometrial secretion in the uterine lumen, and therefore provides a favorable environment for bacterial growth. The endogenous or exogenous progesterone levels are one of the possible causes of developing the pyometra. The aims of this study were to determine the innate immune response in the ex vivo canine endometrium to lipopolysaccharide and the influence of the oestrous cycle and the steroid hormones progesterone, estradiol and dexamethasone in the uterine innate immune response to lipopolysaccharide. For this purpose it was used endometrial explants collected from 37 healthy bitches, adults (2.7 ± 2.5 years) of different breeds submitted to ovariohysterectomy (OSH) elective. In this study, it was established the explants endometrial technique on bitches as a viable experimental model for better understanding the uterine innate immune response. It was concluded that there was no effect of the oestrous cycle stage in the response of cytokines to the challenge of lipopolysaccharide. The addition of exogenous progesterone and estradiol hormones prior to challenge response by LPS stimulates proinflammatory interleukin IL12. The addition of dexamethasone prior to LPS challenge reduced the proinflammatory interleukin IL-6 and stimulated proinflammatory interleukin IL12.

Keywords: oestradiol, progesterone, oestrous cycle, dexamethasone, interleukins

1 INTRODUÇÃO

A piometra é uma infecção bacteriana uterina, que ocorre comumente na fase do diestro em cadelas, período em que a concentração sérica de progesterona é mais elevada, promovendo um acúmulo de secreção endometrial no lúmen uterino e, conseqüentemente, favorecendo um ambiente para o crescimento bacteriano (FRANSSON & RAGLE, 2003).

Esta enfermidade ocorre com maior frequência em fêmeas com idade média de oito anos ou que passaram por tratamentos com progestágenos (HAGMAN et al., 2009). A incidência de complicações intrauterinas é significativa em animais que fizeram uso de progestágenos, de forma prolongada e indiscriminada, como forma de método contraceptivo ou na tentativa de evitar transtornos decorrentes do estro (KIM & KIM, 2005; MOREIRA et al., 2008).

Os níveis de progesterona endógena ou exógena são uma das possíveis causas do desenvolvimento da piometra, em níveis altos esta tem efeito negativo na habilidade do útero em resistir ou eliminar infecções bacterianas, influenciando na diminuição do pH intra-uterino, proporcionando condições favoráveis ao desenvolvimento de bactérias (WANKE & GOBELLO, 2006; CONCANNON, 2011).

Estudos afirmam que, em aproximadamente 80% dos animais a piometra é causada por bactérias aeróbicas. O microorganismo isolado com maior frequência é a *Escherichia coli* (DHALIWAL et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001; MOREIRA et al., 2008; GARCIA FILHO et al., 2012; SILVEIRA et al., 2013).

Segundo Fransson e Rangle (2003), não existem evidências conclusivas de que a piometra é causada por um distúrbio na produção de progesterona, ou do efeito destes na resposta imune uterina, sendo necessário que novas pesquisas tenham como foco a influência destes hormônios ovarianos na imunidade uterina, assim como a interação bacteriana e a resposta imune uterina, nos diferentes estágios do ciclo estral.

Assim, pesquisas que visam compreender os mecanismos envolvidos na resposta imune inata uterina de cadelas, nas diferentes fases do ciclo estral,

devem ser realizadas para melhor compreensão das infecções uterinas, principalmente, nos casos de piometra.

Uma das alternativas da realização destas pesquisas, sem a necessidade da utilização de animais na experimentação animal, utilizando modelos *in vitro* com a possibilidade de mimetizar infecções uterinas, sob diferentes condições de concentrações de hormônios ovarianos seria o uso de explantes endometriais. Estes explantes podem ser colhidos de cadelas submetidas a cirurgias eletivas de ovariectomia.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos hormônios esteroides na imunidade inata uterina por meio de explantes uterinos de cadelas saudáveis.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ciclo Estral da Cadela

O ciclo estral caracteriza-se por modificações cíclicas que ocorrem nas cadelas após a puberdade, aproximadamente de nove a 10 meses de idade, sofrendo variações de acordo com idade reprodutiva, peso, raças diferentes e características individuais dos animais. Esta fase é definida como ritmo funcional do aparelho reprodutor feminino, regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente aqueles referentes à secreção hormonal ovariana (NELSON & COUTO, 2010).

O ciclo estral canino é dividido em quatro fases: proestro, estro, diestro e anestro, além de ser geralmente descrito como sendo monoéstrico e não sazonal, porque as fêmeas podem ciclar a qualquer momento do ano (JOHNSTON et al., 2001; CONCANNON, 2011).

2.1.1 Proestro

Possui duração média de nove dias, podendo variar de três a 17 dias, sendo este o período em que a fêmea atrai o macho, mas ainda não está receptiva a cópula. Pode-se observar edema na vulva e secreção serosanguinolenta (NELSON & COUTO, 2010). Sob influência do Hormônio Folículo Estimulante (FSH), os folículos ovarianos em quiescência se desenvolvem e as células foliculares produzem estradiol. Este hormônio é o responsável pelo desencadeamento dos sinais clínicos e comportamentos característicos do proestro (WANKE & GOBELLO, 2006).

Com a ação do estradiol ocorre a proliferação das células epiteliais da mucosa vaginal e sua maturação (cornificação), aumento da espessura da camada endometrial, aumento do número de receptores de progesterona do endométrio, promove abertura da cérvix, aumenta o fluxo sanguíneo (descargas vulvares) e a resposta inflamatória celular (globulos brancos) (JEFFCOATE, 2000).

O grau de influência estrogênica e, por consequência, a fase do ciclo estral no que diz respeito à concentração sérica de estradiol, podem ser monitoradas por meio de citologia vaginal (NELSON & COUTO, 2010). No esfregaço vaginal observa-se a presença de eritrócitos e uma mistura de células epiteliais; do meio para o fim do proestro, o percentual de células parabasais e intermediárias pequenas diminui e o percentual de células superficiais e intermediárias aumentam (JOHNSTON et al., 2001; ALLISON et al., 2014).

Endocrinologicamente, as concentrações séricas de estradiol aumentam para níveis que resultam nas alterações clínicas, acima de 25 pg/mL, atingindo o pico máximo com concentrações em torno de 60 a 70 pg/mL, 24 a 48 horas antes do término do proestro (FELDMAN et al., 2014).

A diminuição do nível de estradiol ocorre antes da cadela se tornar receptiva ao acasalamento. As concentrações séricas de progesterona estão em níveis basais (<1 a 2 ng/mL) até o fim do proestro, quando estas começam a subir. Este aumento de progesterona sérica está relacionada com o pico pré-ovulatório de Hormônio Luteinizante (LH) que ocorre um dia antes da transição do proestro para o estro, e sua duração varia entre 24 a 96 horas (JOHNSTON et al., 2001).

2.1.2 Estro

A duração média desta fase é de três a 21 dias (\pm 9 dias), é caracterizado pela receptividade da fêmea ao macho, permitindo o coito. A vulva ainda se encontra edemaciada, mas o corrimento vaginal muda sua coloração, passando a transparente e incolor, ou amarelo-palha (JOHNSTON et al., 2001). À citologia vaginal, nesta fase, observam-se mais de 90% de células anucleadas cornificadas e presença de algumas bactérias, possivelmente devido ao coito (DE BUEN DE ARGÜERO, 2001; HENSON, 2011; ALLISON et al., 2014).

Alguns autores observaram que a cadela começa a exibir os sinais do estro quando a concentração de estrógeno circulante começa a declinar e a

progesterona sérica aumentar, com a luteinização das células da granulosa dos folículos maduros, que passam a produzir progesterona levando ao aumento de sua concentração no sangue (NELSON & COUTO, 2010; CONCANNON, 2011; FELDMAN et al., 2014).

De acordo com Feldman et al. (2014), as concentrações circulantes de progesterona encontram-se basais (<0,5 ng/mL) até 24 a 72 horas antes do final do proestro, logo após se elevam acima de 1,0 ng/ml. Na onda pré-ovulatória de LH, a concentração de progesterona se encontra em torno de 2 a 4 ng/mL. Esse aumento na concentração da progesterona (mínimo de 1,0 ng/mL) é considerado responsável pelo comportamento receptivo da fêmea ao macho (JOHNSTON et al., 2001).

Na ovulação, dois dias após o pico de LH, a concentração de progesterona se encontra entre 4 a 10ng/mL. Quando a fêmea não está mais receptiva ao macho, considera-se fim do estro e início do diestro (JOHNSTON et al., 2001; OLIVEIRA & MARQUES JR, 2006; CONCANNON, 2011; FELDMAN et al., 2014).

2.1.3 Diestro

Com duração de aproximadamente dois a três meses, o edema vulvar, progressivamente diminui até desaparecer e, apenas uma quantidade limitada de corrimento vaginal poderá estar presente (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Na citologia vaginal, evidenciam-se mais de 50% de células intermediárias e parabasais. De Buen de Argüero (2001) e Allison et al. (2014) relataram que, nessa fase, se observa a presença de poucos eritrócitos, bactérias e numerosos neutrófilos.

O diestro é dominado pela progesterona, que atinge um pico máximo de 15 a 90 ng/mL duas a três semanas após o início dessa fase, persistindo por até uma a duas semanas, diminuindo gradualmente até atingir valores basais no final do período, enquanto os outros hormônios encontram-se essencialmente em concentrações basais (JOHNSTON et al., 2001).

Nesta fase as cadelas podem apresentar sinais clínicos como, aumento da glândula mamária, secreção uterina, construção de ninho, adoção de

objetos inanimados, entre outras alterações comportamentais (NELSON & COUTO, 2010).

O útero responde ao aumento da concentração de progesterona mantendo a estrutura glandular e a vascularização adequadas para a gestação. A duração do diestro e a concentração da progesterona, baseada na função lútea, é similar para cadelas não-gestantes e gestantes, o que demonstra que o útero ou prostaglandinas uterinas não seriam responsáveis pela manutenção fisiológica ou regressão do corpo lúteo (CL) (CONCANNON, 2011). Na espécie canina, acredita-se que o CL seja hormônio independente durante a primeira metade do diestro e só a partir desse período passa a requerer suporte luteotrófico, principalmente de prolactina (JOHNSTON et al., 2001).

A progesterona tem como principais funções, a manutenção de um ambiente favorável a uma possível gestação, fechamento da cérvix, aumento do número e atividade das glândulas endometriais, diminuição da motilidade miométrica e diminuição da resposta inflamatória (HAGMAN et al., 2006).

As respostas ou efeitos provocados pelos hormônios estrógeno e progesterona no útero tem efeito cumulativo a cada ciclo estral, e essas respostas podem ser incrementadas se o ovário da cadela estiver sob influência de um cisto, tumor ovariano ou recebendo progesterona exógena (FRANSSON & RAGLE, 2003).

2.1.4 Anestro

Esta é a fase quiescente do ciclo reprodutivo canino, sua duração é de aproximadamente três a seis meses, caracterizado pela não atração dos machos pelas fêmeas, e não receptividade da fêmea ao acasalamento. A vulva se mantém pequena, com ou sem presença de secreção. Na citologia vaginal se observa o predomínio de células parabasais e intermediárias, e raramente há presença de neutrófilos e bactérias (JOHNSTON et al., 2001; CONCANNON, 2011).

No início e meio do anestro, as concentrações de estradiol e progesterona encontram-se basais, havendo elevação do estradiol no final do mesmo. A concentração de FSH encontra-se basal no início e meio do anestro,

apresentando aumento no final desse período. O surgimento episódico de LH pode ser detectado durante o anestro, apresentando maior intensidade no final do mesmo (JOHNSTON et al., 2001; WANKE & GOBELLO, 2006).

2.2 Imunidade Uterina

A resposta imune uterina a infecção inclui, a resposta inata que consiste em mecanismos químicos e celulares de defesa e a resposta adquirida, que por sua vez é um sistema de defesa rápido, efetivo, complexo e sofisticado que confere defesa máxima contra agentes externos. Este sistema complexo é regulado também pelos esteroides ovarianos, estradiol e progesterona (LEWIS, 2003; SUGIURA et al., 2004; BOUMAN et al., 2005; KIDA et al., 2006).

Com o estímulo de um agente patogênico, o organismo promove a ativação da imunidade inata mediada por macrófagos e neutrófilos, que reconhecem moléculas do agente e levam a sinalização intracelular, a ativação de fatores de transcrição e a produção de citocinas (ROBERTSON & COOPERSMITH, 2006; DICKSON, 2009).

As citocinas são proteínas solúveis sintetizadas por várias células do sistema imune, que atuam como reguladores da imunidade e induzem a produção de imunoglobulinas através dos plasmócitos, que vão neutralizar toxinas bacterianas e evitar a sua adesão. A nomenclatura das citocinas é baseada segundo a sua célula de origem ou o bioensaio utilizado para identificá-las (ABBAS et al., 2000; TIZARD & ABEL, 2002).

No sistema imunológico das fêmeas a progesterona possui uma atividade particular, atuando na modulação da ação de linfócitos T, sendo capaz de suprimir a função destas células, que afetam diretamente a imunidade local favorecendo a instalação de infecção uterina (DĄBROWSKI et al., 2007; MICHELON et al., 2006)

Sob altas concentrações desse hormônio tais linfócitos passam a sintetizar uma proteína imunomodulatória, chamada de Fator Bloqueador Induzido pela Progesterona (Progesterone Induced Blocking Factor – PIBF). Essa proteína PIBF inibe a liberação de ácido aracdônico, que inibe a atividade

das células NK (natural killer) e modifica o balanço de citocinas (MICHELON et al., 2006).

A resposta a infecções bacterianas depende de receptores de reconhecimento padrão, tais como os Toll-like (TLRs), que são expressos por células do endométrio (HERATH et al., 2006, 2009; SHELDON & BROMFIELD, 2011). Em particular, as células epiteliais do endométrio e do estroma têm suas respostas à infecção por *E. coli* mediadas por TLR4, que se liga ao lipopolissacárideo (LPS) que conduz à secreção da quimiocina interleucina 8 (IL8) e a citocina IL-6 (CRONIN et al., 2012).

Em cães, a IL-6 é uma das principais citocinas pro-inflamatórias, um dos indicadores chave da biossíntese e glicosilação de proteínas de fase aguda no fígado e, em concentrações elevadas refletem a ativação de uma resposta inflamatória (MOSHAGE et al., 1988; HACK et al., 1997).

O aumento da incidência de piometra, na fase inicial do diestro, está relacionado à redução da resposta celular Th1 antígeno-específico e diminuição da imunidade celular pela progesterona (SUGIURA et al., 2004). Células Th1 estão envolvidas na imunidade mediada por células e secretam interleucinas (IL) como IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, interferon gama (IFN γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α).

A IL-12 promove forte imunidade celular mediada pelo Th1 (CHALLIS et al., 2009), além disso, é considerada uma das maiores citocinas pró-inflamatórias, pois estimula a síntese de óxido-nítrico e outros mediadores da inflamação. O TNF α e IFN γ aumentam a atividade de macrófagos e, conseqüentemente, ocorre maior neutralização das bactérias devido a produção de óxido nítrico (SUGIURA et al., 2004).

Estudos recentes em medicina humana e veterinária sobre os perfis de citocinas durante a gestação têm demonstrado o comportamento dessas unidades na imunologia gestacional. Quanto à piometra, não existem relatos sobre o comportamento de citocinas em fêmeas, mas sugere-se que este conhecimento pode prevenir a ocorrência da doença em cadelas durante o diestro ou melhorar o prognóstico de fêmeas em casos graves (DENNEY et al., 2011; FELICIANO et al., 2007; SILVA et al., 2012).

2.3 Piometra

A infecção bacteriana uterina, também conhecida como piometra, ocorre comumente em 25% das cadelas não castradas (EGENVALL et al., 2001) e trata-se da uteropatia mais comum em cadelas (BIDDLE & MACINTIRE, 2000). Geralmente, é causada por bactérias gram-negativas levando a severa inflamação local e sistêmica (HAGMAN & GREKO, 2005). Complicações graves da resposta inflamatória sistêmica podem levar a endotoxemia, sepse e/ou choque séptico (BRADY & OTTO, 2001; HAGMAN et al., 2006). Além disso, a insuficiência renal aguda pode elevar acima de 70% a mortalidade das cadelas (FERREIRA, 2007).

A piometra ocorre na primeira metade do diestro, sendo a *Escherichia coli* o agente etiológico mais comumente encontrado. Nesta fase do ciclo estral há aumento da concentração de progesterona endógena (DHALIWAL et al., 1998; TSUMAGARI et al., 2005) que favorece maior aderência da bactéria no tecido endometrial devido a presença de menor resposta imune (KIDA et al., 2006; ISHIGURO et al., 2007). A progesterona endógena ou exógena pode levar ao quadro de hiperplasia endometrial cística e esta pode predispor o aparecimento de infecções oportunistas e o desenvolvimento da piometra (CONCANNON, 2011).

A ovariossalpingohisterectomia (OSH) é o tratamento mais efetivo na piometra e geralmente resulta em rápida recuperação do animal (FRANSSON & RAGLE, 2003; HAGMAN, et al., 2009; GARCIA FILHO et al., 2012). Contudo, uma pesquisa (SILVA et al., 2010) ressaltou que os receptores tipo *toll* (TLRs), que estão envolvidos na resposta inflamatória precoce (HORNE et al., 2008), podem ser alvos terapêuticos na prevenção da infecção bacteriana uterina e potencialmente em outras espécies.

De fato, a imunossupressão é um fator predisponente e observado em cadelas com piometra e a alteração hormonal durante o ciclo estral influencia nesta queda da resistência imunológica (FALDYNA et al., 2001; SUGIURA et al., 2004). No entanto, a cascata de eventos que levam a resposta inflamatória uterina ainda são pouco conhecidas (SILVA et al., 2010), principalmente,

relativo à resposta imune das células do epitélio endometrial, considerado o local de primeiro contato com o agente etiológico.

2.4 Explantes Endometriais

O cultivo de explantes é uma técnica ainda em desenvolvimento, mas que se mostra eficaz em pesquisas de laboratório. Também conhecido como método *ex vivo*, caracteriza-se pelo cultivo de fragmentos de órgãos colhidos com *punch* de biópsia ou bisturi, incubados em placas com meio de cultura em temperatura semelhante à corpórea, mimetizando as condições do organismo vivo (BANSAL et al., 2009; RANDALL et al., 2011).

O modelo *ex vivo* é relatado desde a década de 30, inicialmente descrita em órgãos de embriões de aves (FELL & ROBISON, 1930), posteriormente, tecidos provenientes de ratos adultos foram cultivados e a viabilidade tecidual dos diversos órgãos cultivados por nove dias foi avaliada (TROWELL, 1959). Browning e Trier (1969) fizeram adaptações à técnica, adicionando nutrientes ao meio de cultura, associando a incubação em estufa a 37°C com 95% O² e 5% CO².

Apesar das limitações, a técnica permite submeter fragmentos de órgãos do mesmo doador a diversos tratamentos, além de controlar as condições ambientais às quais o tecido é submetido. Poucos animais são necessários, uma vez que a partir de um animal são produzidos inúmeros explantes, facilitando a realização de experimentos e ampliando as áreas de investigação científica, onde a utilização de animais tem sido cada vez mais difícil, devido aos aspectos éticos e legais (KOLF-CLAUW et al., 2009; RANDALL et al., 2011).

O tempo de incubação com manutenção da viabilidade celular, dependendo do tecido, é um fator limitante desse modelo. Contudo, a aplicação de doses definidas das substâncias de interesse diretamente no órgão alvo, comparando amostras tratadas e controles provenientes de um único doador, permite a obtenção de resultados mais fidedignos (RANDALL et al., 2011).

Em cadelas, ainda há poucos estudos que padronizam a técnica de explantes endometriais e a correlacionam com imunidade uterina (SILVA et al.,

2012; KARLSSON et al., 2015;), as principais referências encontradas desse assunto são de estudos realizados em vacas (BORGES et al., 2012; SAUT et al., 2014).

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS E LOCAL DE EXECUÇÃO

O presente estudo foi conduzido utilizando fêmeas caninas (*Canis familiaris*) do Projeto de Extensão de Castração do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia – FAMEV/ UFU e Prefeitura Municipal de Uberlândia e aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) com o número de protocolo 046/13. Foram utilizadas 37 fêmeas, adultas ($2,7 \pm 2,5$ anos), de raças variadas, clinicamente saudáveis avaliadas por meio de exame clínico proposto (FEITOSA, 2014) e do hemograma, submetidas à ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva. A história clínica dos animais e os dados em relação ao comportamento sexual e fase do ciclo estral foram anotados em fichas específicas.

3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As cadelas foram submetidas à retirada de úteros e ovários pela técnica de ovariohisterectomia (OSH), de acordo com Slatter (2007). Imediatamente após a OSH, foram selecionados somente úteros sem evidência aparente de infecção por meio da visualização macroscópica e transportados em caixas térmicas (refrigerado) ao Laboratório de Saúde em Grandes Animais – (LASGRAN - FAMEV/UFU) para o processamento. Dos animais selecionados foram coletados 4 mL de sangue por meio de punção da veia cefálica, com agulha 25X7 acoplada a seringa de 5 mL descartável e acondicionadas em tubos com EDTA-K2 para determinação da concentração plasmática de progesterona.

No laboratório, os úteros selecionados foram processados e realizado os tratamentos de acordo com os três experimentos propostos. Com intuito de determinar a resposta imune inata do endométrio canino *ex vivo* a lipopolissacarídeos (*E.coli* 0111:B4), realizou-se **experimento 1** utilizando 8 animais. No **experimento 2**, com intuito de avaliar a influência do ciclo estral

na resposta imune inata uterina a lipopolissacarídeos (*E.coli* 0111:B4) foram utilizadas 29 cadelas. No **terceiro experimento**, com intuito de avaliar a influência da progesterona, estradiol e dexametasona resposta imune inata uterina a lipopolissacarídeos (*E.coli* 0111:B4) foram utilizadas as mesmas 29 cadelas do segundo experimento.

3.3. DOSAGEM DE PROGESTERONA

As amostras de sangue, no laboratório, foram centrifugadas a 720g, durante 8 minutos, em centrífuga Excelsa Baby (centrífuga marca FANEM, modelo 206), e o plasma separado em microtubos tipo eppendorf, e armazenado a menos 80°C até o momento das análises. A dosagem de progesterona foi feita pela técnica de quimioluminescência (CHENG et al., 2012).

3.4. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

3.4.1. Experimento 1 - processamento dos explantes: No laboratório, a superfície externa do útero foi lavada com etanol 70% e realizada a incisão longitudinal do corno uterino com tesoura estéril. O endométrio foi exposto e lavado com solução de Dulbecco's phosphate-buffered (D-PBS; Sigma-Aldrich Ltd, Dorset, UK) suplementado com 50 UI/mL de penicilina, 50 µg/mL estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 2,5 µg/mL anfotericina B (Sigma-Aldrich). Os tecidos foram coletados do endométrio com o auxílio de *punch* estéril próprio para biopsia de 8 mm e inserido em 25 ml de solução de Hank's Balanced Salt (HBSS; Sigma-Aldrich) suplementado com 50 UI/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina e 2.5 µg/mL anfotericina B.

Um fragmento de 8mm do tecido uterino restante foi fixado em formaldeído 10% e utilizado para exame histopatológico. No interior de uma cabine de segurança realizou-se duas passagens dos explantes na mesma solução de Hank's Balanced Salt (HBSS; Sigma-Aldrich) suplementado com 50

UI/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina e 2.5 µg/mL anfotericina B por 5 minutos.

Os explantes foram então transferidos individualmente para placas de cultura celular com 24 poços com 2 mL de meio completo de cultura composto por RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640, FBS (soro fetal bovino-Cultilab) tratado com T-70 dextran (Sigma-Aldrich C6241) com carvão livre de esteroides, suplementado com 50 UI/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina e 2.5 µg/mL anfotericina B.

3.4.2. Experimento 2:

3.4.2.1. Determinação da resposta imune do endométrio e miométrio canino ex vivo a lipopolissacarídeos (*E.coli* 0111:B4): foram coletados 12 explantes do endométrio de cada uma das oito cadelas selecionadas, e expostos ao tratamento com lipopolissacarídeos (LPS) ultra-puros obtidos da Invitrogen (Nottingham, UK), em cinco concentrações de 0,001µg/mL, 0,01µg/mL, 0,1µg/mL, 1µg/mL e 10µg/mL e um controle, usado de acordo com as instruções do fabricante. As soluções estoque e base do LPS eram, 5mg/mL e 1mg/mL, respectivamente, diluídas em água ultra pura. Foram realizadas duas baterias e, após 12 e 24 horas de tratamento, em estufa de 5% CO₂ a 37°C, cada explante foi pesado e o sobrenadante congelado a menos 20°C para posterior análise.

3.4.2.2. Avaliação da influência do ciclo estral na resposta imune uterina a lipopolissacarídeos (*E.coli* 0111:B4): foram utilizadas 29 cadelas e de cada endométrio utilizado dois explantes, um controle e outro exposto ao tratamento com 1µg/ml de LPS. Após 24 horas de tratamento em estufa de 5% CO₂ a 37°C, cada explante foi pesado e o sobrenadante congelado a menos 20°C para posterior análise.

3.4.2.3. Avaliação da influência da progesterona, estradiol e dexametasona na resposta imune inata uterina a lipopolissacarídeos (*E.coli* 0111:B4): para este experimento foram utilizadas as mesmas 29 cadelas do experimento 2 e de

cada endométrio foram coletados mais cinco explantes. Os explantes foram tratados durante 24 horas da seguinte forma: a) dois controles; b) meio contendo 5ng/ml de progesterona (Sigma-Aldrich P8783); c) meio contendo 3pg/ml de estradiol (Sigma-Aldrich E2758); d) meio contendo 5ng/ml de dexametasona (Sigma-Aldrich D4902). As soluções estoque e base dos hormônios e da dexametasona eram, 20µg/mL e 10µg/mL, respectivamente, todas diluídas em etanol absoluto. Após 24 horas de tratamento em estufa de 5% CO₂ a 37°C, o sobrenadante foi retirado e congelado a menos 20°C para posterior análise. Os explantes permaneceram na placa de cultivo por mais 24 horas, sendo tratados da mesma forma que inicialmente procedido, no entanto submetidos ao tratamento com 1µg/ml de LPS. Finalizadas as 24 horas das placas em estufa de 5% CO₂ a 37°C, cada explante foi pesado e o sobrenadante congelado a menos 20°C para posterior análise.

3.5. DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS PELA TÉCNICA DE ELISA

As concentrações de IL6 e IL12 foram avaliadas no sobrenadante e mensuradas por técnicas específicas de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (DuoSet® ELISA Canine IL-6 p40 kit; R&D Systems Inc., Minneapolis, USA; DuoSet® ELISA Canine IL-12/IL-23 p40 kit; R&D Systems Inc., Minneapolis, USA).

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística e confecção dos gráficos, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e o animal considerado como unidade experimental. Os dados foram tabulados em planilhas do programa Microsoft Excel e a estatística descritiva apresentada em média e erro padrão da média.

Para avaliar a presença de diferença nas concentrações de IL6 e IL12 quando os explantes foram submetidos a diversas concentrações de LPS por 12/24 horas, inicialmente, os dados foram submetidos ao Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se apresentavam ou não distribuição

paramétrica. As variáveis com distribuição paramétrica foram submetidas à análise de variância (ANOVA paramétrica) e pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni. As variáveis com distribuição não-paramétrica foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis (Anova não-paramétrica) e pós-teste de Comparação Múltipla de Dunn's.

Para avaliar se havia influência do ciclo estral e diferença entre hormônios esteroides na resposta imune inata do endométrio canino ex vivo na presença de LPS , utilizou-se a análise de variância (Two-way ANOVA) e nas situações onde houve significância o pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni foi conduzido. O nível de significância para todos os testes foi $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Para facilitar a avaliação dos resultados obtidos, optou-se pela divisão deste capítulo em três partes de acordo com cada experimento, sendo a primeira, destinada à avaliação da resposta imune inata do endométrio canino *ex vivo* em diferentes tempos de exposição e concentrações de lipopolissacarídeos; a segunda, destinada à influência do ciclo estral na resposta imune uterina a lipopolissacarídeos; a terceira parte compreendeu em verificar a influência dos hormônios esteroides ovarianos na resposta imune inata a lipopolissacarídeos.

4.2 RESPOSTA IMUNE INATA DO ENDOMÉTRIO CANINO *EX VIVO* EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÕES DE LIPOPOLISSACARÍDEOS : EXPERIMENTO 1.

Para avaliar o comportamento da resposta imune inata dos explantes de endométrio de cadelas quando submetidas à LPS, foram utilizados explantes com pesos médios de $52,3 \pm 19,38$ mg e $52,1 \pm 23,7$ mg às 12 e 24 horas, respectivamente. Não houve diferença entre as médias dos pesos dos explantes ($P=0,975$).

Houve acúmulo de IL6 ($P=0,0011$) e IL12 ($P=0,0044$) durante 12 horas de exposição e este acúmulo foi crescente na dependência da concentração de LPS no meio entre 0,001–10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 1A,C). Quando os explantes foram expostos às mesmas concentrações crescentes de LPS durante 24 horas, também houve acúmulo de IL6 ($P=0,0017$) e IL12 ($P=0,0086$) no meio (figura 1 B,D), em comparação com o grupo controle.

O comportamento temporal entre as duas citocinas foi distinto nos momentos avaliados, entre 12 e 24 horas. O estímulo da liberação de IL6 foi proporcional ao tempo da exposição ao LPS, independente da concentração utilizada, sendo maior nas 24 horas do que às 12 horas de exposição. Para a

IL12, as maiores concentrações foram observadas às 12 horas de exposição na comparação com as 24 horas.

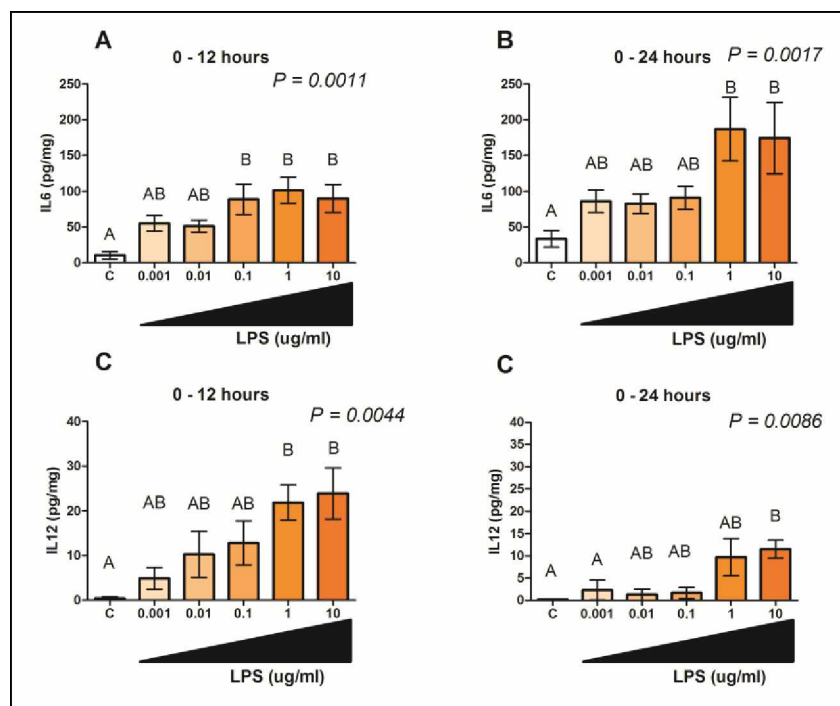


Figura 1. Explantes de endométrio intactos em resposta a lipopolissacarídeos com 12 e 24 de exposição. Explantes de endométrio intactos de cadelas foram cultivados em meio controle ou meio contendo aumentos crescentes (10x) de 0,001–10 µg/ml de lipopolissacarídeos (*E.coli* 0111:B4). Os resultados foram apresentados através da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média (n=8).

4.3 INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL NA RESPOSTA IMUNE UTERINA A LIPOPOLISSACARÍDEOS

Para investigar o efeito do ciclo estral na resposta imune inata os animais foram divididos conforme a concentração plasmática de progesterona em < 1ng/ml (n=15), 1 < P4 < 4 ng/ml (n=5) e > 4 ng/ml (n=9). Os explantes de endométrio intactos acumularam mais IL6 (P=0,0169) e IL12 (P=0,0003) em resposta ao LPS, entretanto não houve diferença entre os grupos para IL6 (P=0,6777) e IL12 (P=0,4516).

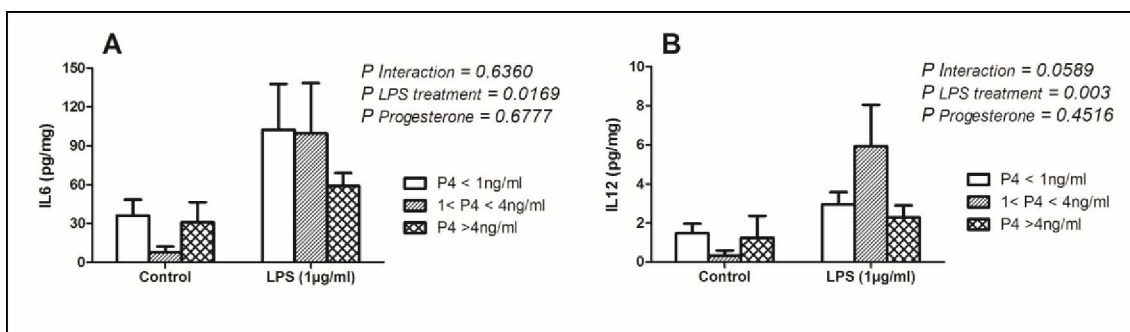


Figura 2. A resposta de explantes de endométrio intactos a lipopolissacarídeos não é afetada pelos estágios do ciclo estral. Explantes endometriais de cadelas divididas segundo a concentração plasmática de progesterona ($P_4 < 1\text{ ng/ml}$ - $n=15$; $1 < P_4 < 4\text{ ng/ml}$ - $n=5$ e $P_4 > 4\text{ ng/ml}$ - $n=9$) foram cultivados em meio controle ou meio contendo $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ de lipopolissacarídeos (*E.coli* 0111:B4). Os sobrenadantes foram retirados após 24 horas de cultura para mensuração do acúmulo de IL6 (a) e IL12 (b). Os resultados foram apresentados através da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média.

4.4 INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS ESTEROIDES OVARIANOS NA RESPOSTA IMUNE INATA A LIPOPOLISSACARÍDEOS

Pelo fato de não ter se observado efeito dos níveis plasmáticos de progesterona sobre a resposta inflamatória endometrial após o estímulo com LPS, uma alternativa foi testar se os hormônios esteroides ovarianos poderiam regular a imunidade inata endometrial, por meio do tratamento prévio de explantes endometriais intactos com esteroides exógenos antes do desafio com LPS.

Nas primeiras 24 horas de exposição dos explantes endometriais intactos aos hormônios ovarianos verificou-se que os explantes acumularam mais IL6 ($P=0,0001$) e IL12 ($P=0,0006$) em resposta ao LPS e sem interferência da exposição ao estradiol e progesterona.

Após a exposição dos explantes a LPS (24-48 horas), houve resposta ao desafio com acúmulo de IL6 ($P<0,0001$) e IL12 ($P<0,0001$). Houve também efeito do prévio tratamento com progesterona ou estradiol na resposta ao LPS, onde ambos os esteróides acumularam mais IL6 e IL12. Além disso, o tratamento prévio com dexametasona reduziu o acúmulo de IL6 após o estímulo com LPS, já para IL12 o tratamento prévio com dexametasona incrementou a resposta antes (0-24 horas) e após (24-48 horas) o estímulo com LPS.

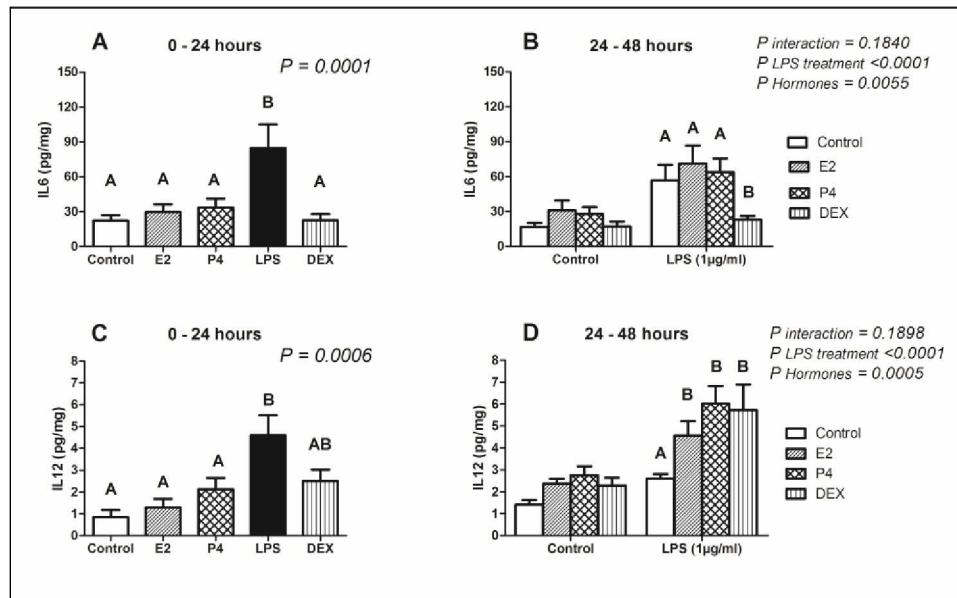


Figure 3. Hormônios esteroides exógenos regulam a resposta de IL12 ao LPS. Os sobrenadantes foram retirados após 24 e 48 horas de cultura para mensuração do acúmulo de IL6 (a,b) e IL12 (c,d). Os resultados foram apresentados através da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média.

5. DISCUSSÃO

5.1. Uso de explantes endometriais como modelos experimentais *ex vivo* no estudo da imunidade inata em cadelas

O uso de explantes endometriais para elucidação de mecanismos da imunidade inata em cadelas tem sido pouco explorado (BORGES et al., 2012; SILVA et al., 2012), diferentemente do observado em bovinos (BORGES et al., 2012; SAUT et al., 2014). Em bovinos a justificativa destes estudos está baseada na alta incidência de infecções uterinas que ocorrem no pós-parto (SHELDON et al., 2009).

No entanto, em cães a piometra é uma importante doença que acomete 25% das cadelas não castradas (EGENVALL et al., 2001) e trata-se da uteropatia mais comum nessa espécie (BIDDLE & MACINTIRE, 2000). Complicações graves da resposta inflamatória sistêmica nessa enfermidade podem levar a endotoxemia, sepse e/ou choque séptico (BRADY & OTTO, 2001; HAGMAN et al., 2006). Adicionalmente a piometra leva a insuficiência renal aguda que pode elevar acima de 70% a mortalidade das cadelas (FERREIRA, 2007), o que justifica o melhor entendimento da resposta imune inata uterina em cadelas e a busca por outros modelos experimentais.

Uma das opções de modelos experimentais é a utilização de explantes de endométrio, onde é possível preservar a estrutura e manter a viabilidade deste tecido para avaliação da resposta imune inata, fornecendo assim um modelo *ex vivo* para tais estudos (BORGES et al., 2012), já que o cultivo de tecidos ou células para tais estudos, geralmente, alteram a arquitetura dos tecidos e seu arranjo celular, elementos estes que são necessários para o funcionamento normal (COOKE et al., 1997; CUKIERMAN et al., 2001; VOGEL & SHEETZ, 2006).

Além disso, na realização de explantes, para estudo do processo inflamatório, surgiu a constatação que alterações de tecidos ou células poderiam estimular a imunidade inata e causar inflamação (CHEN & NUÑEZ, 2010; KRYSKO et al., 2011). Neste estudo pôde-se constatar o acúmulo das interleucinas 6 e 12 durante 12 e 24 horas de exposição e este acúmulo foi

crescente na dependência da concentração de LPS, mostrando que o tecido permanecia preservado e viável montando uma resposta imune ao estímulo, dados estes que corroboram com os encontrados por Borges et al. (2012) em endométrio bovino. Karlsson et al. (2015) também demonstraram, em cadelas, a resposta dependente da concentração de LPS, baixa dose (100 ng/ml) *versus* alta dose (1µg/ml), por meio da expressão gênica das quimiocinas IL-8, CXCL5 e CXCL10, entretanto, em cultivo de células estromais do endométrio.

A liberação de citocinas e quimiocinas tem um efeito sobre o início das respostas imunes inata e adaptativa, dentro do trato reprodutor feminino (QUAYLE, 2002; SCHAEFER et al., 2004). A resposta dose-dependente de LPS dos explantes endometriais, observada neste experimento, para as duas citocinas avaliadas, corroboram com os estudos anteriores que mostraram um aumento na expressão de receptores tipo *Toll* 4, utilizados para reconhecimento do LPS, em células estromais (SILVA et al., 2010) e explantes endometriais (PANTALEO et al., 2013).

Os mecanismos da resposta imune inata são dependentes de receptores padrões *Toll-like* (TLRs) que reconhecem e interagem com os PAMP (pathogen-associated molecular patterns) sintetizados por esses microrganismos e, desse modo, iniciam uma cascata de eventos de sinalização que incluem uma resposta inflamatória precoce (HORNE et al., 2008; SILVA et al., 2010, 2012).

O LPS compõe a membrana externa de bactérias gram-negativas e, atua na integridade estrutural e na proteção da bactéria. Além disso, faz mimetismo, pois um grande número de bactérias diferentes parecem iguais, isso dificulta uma resposta mais específica e eficiente do organismo a cada uma delas (MORAN et al., 1996). Este estudo utilizou o LPS para desafiar os explantes, pois a bactéria *E. coli* é a bactéria gram-negativa mais frequentemente isolada no complexo hiperplasia endometrial cística - piometra (HAGMAN & GREKO, 2005; SILVA et al., 2010).

Em seus estudos, Silva et al. (2010) relataram pela primeira vez, o envolvimento da cascata de sinalização TLRs na resposta inflamatória uterina desafiado pela infecção por *E. coli* na cadela. Embora os receptores TLR2 e TLR4 terem sido codificados no endométrio canino na fase de diestro, estes

genes foram significativamente estimulados nos casos de piometra por *E.coli*, possivelmente devido à ação do LPS, sobre as células do endométrio (ZÄHRINGER et al., 2008).

Posteriormente, Silva et al. (2012) mostraram que há a codificação de TLR1-7 e 9 no endométrio canino em todas as fases do ciclo estral, esta observação indica que o endométrio canino é capaz de reconhecer uma grande variedade de PAMPs e ativar uma resposta imune inata contra patógenos bacterianos e virais.

Na literatura consultada foram encontrados quatro (SILVA, et al. 2010, 2012; BORGES et al., 2012; SAUT et al., 2014;) experimentos que usaram explantes endometriais e, destes, dois (SILVA, et al., 2010, 2012) avaliaram a expressão gênica de TLRs e somente dois (BORGES et al., 2012; SAUT et al., 2014) realizaram a dosagem das citocinas no sobrenadante.

Muitas pesquisas encontradas em cadelas avaliaram a expressão gênica de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, COX1, COX 2 ou receptores tipo *toll* do tecido endometrial (SILVA et al., 2010; KARLSSON et al., 2015). Na maioria das pesquisas utilizam se os cultivos celulares e estimulação da resposta com *E. coli* ou LPS, como os de Karlsson et al. (2015), que mostraram o aumento da expressão gênica das quimiocinas IL-8, CXCL5 e CXCL10 de células do estroma endometrial de cadelas saudáveis e sem infecções uterinas, além do aumento destas quimiocinas em cadelas com piometra comparada a cadelas saudáveis.

No presente estudo a IL6 apresentou uma dinâmica temporal diferente ao observado por Borges et al. (2012) em explantes endometriais bovinos estimulados com a mesma concentração de LPS (1µg/ml) nas 12 e 24 horas, onde o acúmulo de IL6, IL1β e IL8 foram maiores nas primeiras 12 horas e reduziram às 24 horas, semelhante ao observado com a IL12 neste estudo. Em cadelas não foi encontrado nenhum trabalho que avaliou a concentração de citocinas pró-inflamatórias com diferentes tempos de exposição, sendo o primeiro trabalho a apresentar a dinâmica destas citocinas em explantes endometriais em cadelas.

A citocina pró-inflamatória IL-6 está envolvida na diferenciação de linfócitos B, recrutamento de leucócitos, produção de anticorpos e síntese de

proteínas de fase aguda, que são importantes componentes na defesa contra bactérias (ROMANO et al., 1997; ISHIKAWA et al., 2004; SCHAEFER et al., 2004; ABOUSSAHOUD et al., 2010).

A IL-12 promove forte imunidade celular mediada pelo Th1 (CHALLIS et al., 2009), além disso, ela é considerada uma das maiores citocinas pró-inflamatórias, pois estimula a síntese de óxido-nítrico e outros mediadores da inflamação. O TNF α e IFN γ aumentam a atividade de macrófagos e, conseqüentemente, ocorre uma maior neutralização das bactérias devido a produção de óxido nítrico (SUGIURA et al., 2004).

5.2. Efeito do ciclo estral na resposta imune inata uterina em cadelas

Diversos trabalhos mostram a predisposição da fase de diestro em reduzir a imunidade uterina em cadelas, demonstrando desta forma o efeito dos hormônios ovarianos na imunidade.

Tsumagari et al. (2005) relataram que o útero fica mais susceptível a *E. coli* inoculadas entre 11-30 dias após o pico de LH. A supressão da imunidade celular observada na primeira parte do diestro é um possível resultado das concentrações de progesterona crescentes, e a baixa nos níveis de estradiol (SUGIURA et al., 2004). Além disso, a progesterona causa um aumento na ligação da *E. coli* com o endométrio (LEITNER et al., 2003; ISHIGURO et al., 2007)

Neste trabalho, assim como nos trabalhos realizados em bovinos (BORGES et al., 2012; SAUT et al., 2014) que avaliaram a expressão gênica e concentração das citocinas IL-6, IL-1 β e IL-8, os explantes de endométrio intactos não foram afetados pelos estágios do ciclo do estral. A resposta à presença de LPS no cultivo estimulou a síntese e lançamento de IL6 e IL12 pelos explantes, mas não houve diferença na concentração das interleucinas entre os grupos divididos segundo a concentração de progesterona

Pelo fato de não ter se observado efeito dos níveis de progesterona sobre a resposta inflamatória endometrial após o estímulo com LPS, uma alternativa foi testar se os hormônios esteroides ovarianos poderiam regular a

imunidade inata endometrial, por meio do tratamento prévio de explantes endometriais intactos com esteroides exógenos antes do desafio com LPS.

Nas primeiras 24 horas de exposição dos explantes endometriais intactos aos hormônios ovarianos verificou-se que os explantes acumularam mais IL6 e IL12 em resposta ao LPS e sem interferência da exposição ao estradiol e progesterona.

Após a exposição dos explantes a LPS (24-48 horas), houve resposta ao desafio com acúmulo de IL6 e IL12. Houve também efeito do prévio tratamento com progesterona ou estradiol na resposta ao LPS, onde ambos os estrógenos acumularam mais IL6 e IL12. Além disso, o tratamento prévio com dexametasona reduziu o acúmulo de IL6 após o estímulo com LPS, já para IL12 o tratamento prévio com dexametasona incrementou a resposta antes (0-24 horas) e após (24-48 horas) o estímulo com LPS.

Silva et al. (2010) relataram que ao longo do ciclo estral no endométrio canino ocorre a transcrição de genes para TLR, o que indica que a resposta imune é mediada pelos TLR, que é um componente importante dos mecanismos de defesa dentro do útero. Entretanto, no início do diestro a transcrição e expressão desses receptores diminui, fator este que favorece a implantação embrionária durante a gestação, mas pode também ser ligado à elevada prevalência de piometra nesta fase do ciclo estral.

Apesar das diferenças encontradas por Silva et al. (2010) nas fases do ciclo estral, no presente estudo observou-se que a síntese das citocinas IL-6 e 12, quando desafiado com LPS, é semelhante no endométrio canino ao longo do ciclo estral. O mesmo foi encontrado por Saut et al. (2014), em explantes de endométrio bovino previamente tratados com hormônios esteroides e desafiados com cepas de *E. coli* vivas e LPS tratados com hormônios exógenos, ao se avaliar a síntese das interleucinas IL-6, IL-1 β e IL-8.

A respeito da resposta imune do endométrio canino, algumas questões ainda devem ser melhor avaliadas, assim como outras moléculas com efeito regulatório poderiam estar envolvidas e que, no presente estudo, não foram avaliadas. Alterações da resposta imune adaptativa teriam um efeito significativo sobre a evolução da doença, ou pode haver um efeito regulatório indireto de esteroides ovarianos sobre a imunidade inata ou adaptativa.

6. CONCLUSÃO

Foi possível estabelecer a técnica de explantes endometriais em cadelas como um modelo experimental viável para aprofundar o entendimento da resposta imune inata uterina.

Não houve efeito do estágio do ciclo estral na resposta das citocinas ao estímulo de lipopolissacarídeos.

A adição de progesterona e estradiol previamente ao desafio por lipopolissacarídeos estimula a resposta da interleucina pró-inflamatória IL12.

A adição de dexametasona previamente ao desafio por lipopolissacarídeos inibe a resposta da interleucina pró-inflamatória IL6 e estimula a interleucina pró-inflamatória IL12.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. (3ª edição). Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
- ABOUSSAHOUD, W.; et al.. Expression and function of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cell lines. **Journal of Reproductive Immunology**, 84(1), 41–51, 2010.
- ALLISON, R. W.; THRALL, M. A.; OLSON, P. N.. Vaginal Citology. In R. L. Cowell & A. C. Valenciano (Eds.), **Cowell and Tyler's diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 4ª edição. Missouri: Mosby Elsevier, 2014.p.582.
- BANSAL, D.; et al. An ex-vivo Human Intestinal Model to Study Entamoeba histolytica Pathogenesis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 3(11), e551. 2009
- BIDDLE, D.; MACINTIRE, D. K. Obstetrical emergencies. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, 15(2), 88–93, 2000.
- BORGES, A. M.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation ex vivo. **American Journal of Reproductive Immunology**, 67(6), 526–39, 2012.
- BOUMAN, A.; JAN HEINEMAN, M.; FAAS, M. M. Sex hormones and the immune response in humans. **Human Reproduction Update**, 2005.
- BRADY, C. A.; OTTO, C. M. Systemic Inflammatory Response Syndrome, Sepsis, and Multiple Organ Dysfunction. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 31(6), 1147–1162, 2001.
- BROWNING, T. H.; TRIER, J. S. Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. **The Journal of Clinical Investigation**, 48(8), 1423–32. 1969.
- CHALLIS, J. R.; et al.. Inflammation and pregnancy. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, 16(2), 206–15, 2009.
- CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G.. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews. Immunology**, 10(12), 826–37, 2010.
- CONCANNON, P. W.. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science**, 124(3), 200–210, 2011.
- COOKE, P. S.; et al. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 94(12), 6535–40, 1997.
- CRONIN, J. G.; TURNER, M. L.; GOETZE, L.; BRYANT, C. E.; SHELDON, I. M. Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biology of**

- Reproduction**, 86(2), 51. 2012.
- CUKIERMAN, E.; PANKOV, R.; STEVENS, D. R.; YAMADA, K. M.. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. **Science**, 294(5547), 1708–12. 2001.
- DĄBROWSKI, R.; WAWRON, W.; & KOSTRO, K.. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. **Theriogenology**, 67(2), 321–327. 2007.
- DE BUEN DE ARGÜERO, N. **Citología diagnóstica veterinaria**. México: El Manual Moderno, 2001.
- DENNEY, J. M.; et al. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. **Cytokine**, 53(2), 170–177, 2011.
- DHALIWAL, G. K.; WRAY, C.; NOAKES, D. E. Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra). **The Veterinary Record**, 143(24), 659–61, 1998.
- DICKSON, S. Sepsis and multiple organ failure. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, 10(4), 165–168, 2009.
- EGENVALL, A.; et al. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, 15(6), 530–538, 2009.
- FALDYNA, M.; LAZNICKA, A.; TOMAN, M. Immunosuppression in bitches with pyometra. **The Journal of Small Animal Practice**, 42(1), 5–10, 2001.
- FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária - A Arte do Diagnóstico - 3ª edição**. Rio de Janeiro: Roca. 2014
- FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W.; REUSCH, C.; SCOTT-MONCRIEFF, J. C. R.; BEHREND, E. N. **Canine and feline endocrinology** (4ª edição). Philadelphia: Saunders, 2014.
- FELICIANO, M. A. R.; MUZZI, L. A. L.; LEITE, C. A. L.; JUNQUEIRA, M. A. Ultra-sonografia bidimensional convencional, de alta resolução e tridimensional no acompanhamento da gestação em cadela. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia**, 59(5), 1333–1337. 2007.
- FELL, H. B.; ROBISON, R. The development and phosphatase activity in vivo and in vitro of the mandibular skeletal tissue of the embryonic fowl. **The Biochemical Journal**, 24(6), 1905–21. 1930.
- FERREIRA, P. C. C. (2007). **Avaliação da hemodiafiltração no período peri-operatório da ovário-salpingo-histerectomia, em cadelas com piometra e refratárias ao tratamento conservador da insuficiência renal aguda**. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo.

- Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10137/tde-09042007-163457/en.php>. Acessado em 27 de agosto de 2016.
- Fransson, B. A.; Ragle, C. A. Canine pyometra; an update on pathogenesis and treatment. **Compendium**, 25(8), 602–610.2003.
- GARCIA FILHO, S. P.; MARTINS, L. L.; SILVA MACHADO, A.; FERNANDES, M. R.. Piometra em cadelas: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 18(1679-7353), 174. 2012.
Disponível em: <http://www.revista.inf.br>. Acessado em 02 de setembro 2016.
- HACK, C. E.; AARDEN, L. A.; THIJS, L. G.. Role of cytokines in sepsis. **Advances in Immunology**, 66, 101–95. 1997.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal** (7ª edição). São Paulo: Manole. 2004.
- HAGMAN, R.; GREKO, C. Antimicrobial resistance in Escherichia coli isolated from bitches with pyometra and from urine samples from other dogs. **The Veterinary Record**, 157(7), 193–6.2005.
- HAGMAN, R.; et al. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2 α metabolite analysis. **Theriogenology**, 66(2), 198–206. 2005.
- HAGMAN, R.; et al. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2 α metabolite analysis. **Theriogenology**, 66(2), 198–206. 2006.
- HAGMAN, R.; RÖNNBERG, E.; PEJLER, G. Canine Uterine Bacterial Infection Induces Upregulation of Proteolysis-Related Genes and Downregulation of Homeobox and Zinc Finger Factors. **PLoS ONE**, 4(11), e8039. 2009.
- HENSON, K. Sistema Reprodutivo. In D. J. M. Rose E. Raskin (Ed.), **Citologia de Cães e Gatos: Atlas Colorido e Guia de Interpretação**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil. 2011. p. 472
- HERATH, S., et al. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. **Endocrinology**, 147(1), 562–70. 2006.
- Herath, S., et al. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2 α to prostaglandin E2 in bovine endometrium. **Endocrinology**, 150(4), 1912–20. 2009.
- HORNE, A. W.; STOCK, S. J.; KING, A. E. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. **Reproduction** 135(6), 739–49. 2008.
- ISHIGURO, K., et al. Reduction of mucin-1 gene expression associated with increased Escherichia coli adherence in the canine uterus in the early stage of dioestrus. **The Veterinary Journal**, 173(2), 325–332. 2007.

- ISHIKAWA, Y.; et al. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, 66(11), 1403–8. 2004.
- Jeffcoate, I. Fisiología y endocrinología de la reproducción en la perra. In G. Simpson, G. C. W. ; England, M. H.; D. Segura Aliaga, **Manual de reproducción y neonatología en pequeños animales**. Reino Unido: BSAVA. 2000. p. 316.
- JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. S. **Canine and Feline Theriogenology** .1ª edição. Philadelphia: Saunders. 2001.
- KARLSSON, I.; et al. Pathogenic Escherichia coli and lipopolysaccharide enhance the expression of IL-8, CXCL5, and CXCL10 in canine endometrial stromal cells. **Theriogenology**, 84(1), 34–42. 2015.
- KIDA, K.; et al. Lactoferrin expression in the canine uterus during the estrous cycle and with pyometra. **Theriogenology**, 66(5), 1325–33. 2006.
- KIM, K. S.; KIM, O. Cystic endometrial hyperplasia and endometritis in a dog following prolonged treatment of medroxyprogesterone acetate. *Journal of Veterinary Science*, 6(1), 81–2. 2005.
- KOLF-CLAUW, M.; et al. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis. **Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA**, 23(8), 1580–4. 2009.
- KRYSKO, D. V.; et al. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. **Trends in Immunology**, 32(4), 157–64. 2011.
- LEITNER, M.; AURICH, J. E.; GALABOVA, G.; AURICH, C.; WALTER, I. Lectin binding patterns in normal canine endometrium and in bitches with pyometra and cystic endometrial hyperplasia. **Histology and Histopathology**, 18(3), 787–95. 2003.
- LEWIS, G. S. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 1, 117. 2003.
- MICHELON, T.; SILVEIRA, J. G.; GRAUDENZ, M.; NEUMANN, J. Imunologia da gestação. **Rev. AMRIGS**, 50(2), 145–151. 2006
- MORAN, A. P.; PRENDERGAST, M. M.; APPELMELK, B. J. Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 16(2), 105–15. 1996.
- MOREIRA, H. R.; MIRANDA, S. A.; DE BRITO, A. B.; PEREIRA, W. L. A.; DOMINGUES, S. F. S. Complexo hiperplasia endometrial cística-piometra em uma cadela tratada com acetato de medroxiprogesterona como método

- contraceptivo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 103, 233–238. 2008
- MOSHAGE, H. J.; et al. The effect of interleukin-1, interleukin-6 and its interrelationship on the synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in primary cultures of adult human hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 155(1), 112–117. 1988.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Medicina interna de pequenos animais. In **Medicina interna de pequenos animais**. 2010. pp. 976 – 983.
- Oliveira, É. C.; Marques Jr., A. P. Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 30(12), 11–18. 2006.
- PANTALEO, M.; PICCINNO, M.; RONCETTI, M.; MUTINATI, M.; RIZZO, A.; SCIORSCI, R. L. Evaluation of serum concentrations of interleukin (IL)-4, IL-10, and IL-12 during pregnancy in bitches. **Theriogenology**, 79(6), 970–973. 2013.
- QUAYLE, A. J. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. **Journal of Reproductive Immunology**, 57(1-2), 61–79. 2002.
- RANDALL, K. J.; TURTON, J.; FOSTER, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. **Cell Biology and Toxicology**, 27(4), 267–84. 2011.
- ROBERTSON, C. M.; COOPERSMITH, C. M. The systemic inflammatory response syndrome. **Microbes and Infection**, 8(5), 1382–1389. 2006.
- ROMANO, M.; et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. **Immunity**, 6(3), 315–25. 1997.
- SAUT, J. P. E.; HEALEY, G. D.; BORGES, A. M.; SHELDON, I. M. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS in vitro. **Reproduction**, 148(6), 593–606. 2014.
- SCHAEFER, T. M.; DESOUZA, K.; FAHEY, J. V.; BEAGLEY, K. W.; WIRA, C. R. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. **Immunology**, 112(3), 428–36. 2004.
- Sheldon, I. M.; Bromfield, J. J. Innate immunity in the human endometrium and ovary. **American Journal of Reproductive Immunology**, 66 Suppl 1, 63–71. 2011.
- SHELDON, I. M.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SCHUBERTH, H.J. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biology of Reproduction**, 81(6), 1025–32. 2009.
- SILVA, E.; et al. Oestrous cycle-related changes in production of Toll-like

- receptors and prostaglandins in the canine endometrium. **Journal of Reproductive Immunology**, 96(1-2), 45–57. 2012.
- SILVA, E.; LEITÃO, S.; FERREIRA-DIAS, G.; LOPES DA COSTA, L.; MATEUS, L. Prostaglandin synthesis genes are differentially transcribed in normal and pyometra endometria of bitches. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, 44 Suppl 2, 200–3. 2009.
- SILVA, E., et al. Gene transcription of TLR2, TLR4, LPS ligands and prostaglandin synthesis enzymes are up-regulated in canine uteri with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex. **Journal of Reproductive Immunology**, 84(1), 66–74. 2010.
- SILVEIRA, C. P. B., et al. Estudo retrospectivo de ovariossalpingo-histerectomia em cadelas e gatas atendidas em Hospital Veterinário Escola no período de um ano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia**, 65(2), 335–340. 2013.
- Sugiura, K.; et al. Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. **Immunobiology**, 209(8), 619–627. 2004.
- TIZARD, I. R.; ABEL, L. J. **Imunologia veterinária : uma introdução** .6ª edição. São Paulo: Roca. 2002
- TROWELL, O. A. The culture of mature organs in a synthetic medium. **Experimental Cell Research**, 16(1), 118–47. 1959.
- TSUMAGARI, S., et al. Induction of canine pyometra by inoculation of *Escherichia coli* into the uterus and its relationship to reproductive features. **Animal Reproduction Science**, 87(3), 301–308. 2005.
- VOGEL, V.; SHEETZ, M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, 7(4), 265–75. 2006.
- WANG, C.; WU, J.; ZONG, C.; XU, J.; JU, H.X. Chemiluminescent Immunoassay and its Applications. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 40(1), 3–10. 2012.
- WANKE, M. M.; GOBELLO, C. Ciclo estral canino. In M. M. Wanke & C. Gobello (Eds.), **Reproducción en caninos y felinos domésticos**. Buenos Aires: Intermédica. 2006. p. 309.
- Zähringer, U.; Lindner, B.; Inamura, S.; Heine, H.; Alexander, C. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. **Immunobiology**, 213(3-4), 205–24. 2008.