

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ÁLISSON DE SOUZA COSTA

**Estudo retrospectivo e *in vitro* da resposta imune uterina em cadelas com
desordens reprodutivas no município de Uberlândia - MG**

UBERLÂNDIA

2018

ÁLISSON DE SOUZA COSTA

Estudo retrospectivo e *in vitro* da resposta imune uterina em cadelas com
desordens reprodutivas no município de Uberlândia - MG

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut

UBERLÂNDIA

2018

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

C837e
2018 Costa, Álisson de Souza, 1974-
Estudo retrospectivo e *in vitro* da resposta imune uterina em cadelas com desordens reprodutivas no município de Uberlândia - MG [recurso eletrônico] / Álisson de Souza Costa. - 2018.

Orientador: João Paulo Elsen Saut.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.1055>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Saúde reprodutiva. 3. Doenças uterinas. 4. Hiperplasia endometrial. 5. Piometra. 6. Citocinas. I. Saut, João Paulo Elsen (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Ata da defesa do TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa d/e: TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/017/2018

Data: 23/08/2018

Discente: *Alisson de Souza Costa* – Matrícula – 11323VET001

Título da Tese: ESTUDO RETROSPECTIVO E *IN VITRO* DA RESPOSTA IMUNE UTERINA EM CADELAS COM DESORDENS REPRODUTIVAS NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA - MG

Linha de pesquisa: CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA

Projeto de Pesquisa de vinculação: AVALIAÇÕES CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS, DIAGNÓSTICAS E TERAPÊUTICAS DAS MOLÉSTIAS CLÍNICAS DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS.

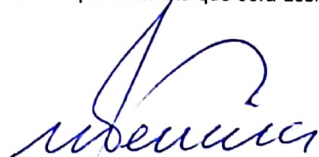
Aos 23 dias do mês de Agosto do ano de 2018 às 16:00 horas no Anfiteatro do Hospital Veterinário – Bloco 2S - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores/Doutores: Antonio Vicente Mundim – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; Fernando Antonio Ferreira – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; Matheus Matioli Mantovani – CENTRO UNIVERSITÁRIO DE PATOS DE MINAS; Francisco Cláudio Dantas Mota – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA e João Paulo Elsen Saut orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. João Paulo Elsen Saut concedeu a palavra ao/a candidato(a) para a exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para resposta. Ultimeada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) APROVADO.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Os trabalhos foram encerrados às 17 horas e 00 minutos, e para constar, lavrou-se a presente ata que será assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 23 de Agosto de 2018.


Prof. Dr. Antonio Vicente Mundim
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA


Prof. Dr. Fernando Antonio Ferreira
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA


Prof. Dr. Matheus Matioli Mantovani
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE PATOS DE MINAS


Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA


Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut
ORIENTADOR

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ÁLISSON DE SOUZA COSTA – Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia (2003). Mestre em Ciências Veterinárias, área de Saúde Animal (Clínica Médica e Investigação Etiológica), pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (2008). Preceptor do Programa de Residência Médico-Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (desde 2012). Ingressou no curso de Doutorado em Ciências Veterinárias, na área de Saúde Animal (Clínica Médica e Investigação Etiológica), da mesma Instituição em setembro de 2013. Durante o decorrer do curso de doutorado e, atualmente, participa do atendimento clínico dos pacientes do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

*“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto
importa o que somos. Vale o que realizamos
com aquilo que possuímos e, acima de
tudo, importa o que fazemos de nós!”*

Chico Xavier

*A minha amada esposa Stefânia, pelo companheirismo,
pelo carinho, pela presença e apoio incondicional.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir concluir esse sonho, agradeço pela vida, pela oportunidade de lutar por minha evolução e de contribuir de alguma forma com o desenvolvimento de nossos irmãos.

Aos meus pais, Amado e Maria do Carmo, que sempre me permitiram ir em busca dos meus sonhos, sem críticas, e com apoio irrestrito.

A Stefânia, esposa querida, sempre presente, acompanhando cada momento até a conclusão desse sonho, sofrendo junto, rindo junto, apoiando incondicionalmente, me dando a força que às vezes eu não conseguia ter, ajudando nas correções e na criação de gráficos e tabelas. Muito obrigado amor! Você foi indispensável na conclusão dessa tese e é insubstituível na minha vida!

Ao Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut por aceitar me orientar, e por acreditar que conseguiríamos. Parabéns pela sua dedicação à pesquisa, em busca sempre de novos desafios.

A graduanda Sara Pedrosa, meu agradecimento especial, porque sem sua ajuda e seu interesse em pesquisa, sem seus finais de semana perdidos fazendo experimentos, nada disso teria acontecido! Meu muito obrigado! Conte sempre comigo e que Deus lhe reserve um futuro brilhante!

A doutoranda médica veterinária Layane Queiroz Magalhães, agradeço imensamente sua ajuda durante todo o processo de testes, sua disposição e presteza. Sua contribuição foi essencial para esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Vicente Mundim, um brilhante mestre e pesquisador. Trabalhamos juntos desde a graduação, me despertou o interesse pela pesquisa. Será sempre um exemplo a seguir.

Aos Professores, Dr. Fernando Antonio Ferreira e Dr. José Eugênio Diniz Bastos, exemplos de dedicação à nobre arte do ensino, sempre me inspiraram a continuar em busca do conhecimento. Obrigado pelos anos de trocas de experiência e compartilhamento do conhecimento dos senhores!

Ao prof. Dr. Selwyn Arlington Headley, e à residente Nayara da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela avaliação das lâminas de histopatológico, fator determinante em nossa pesquisa.

A mestra, Médica Veterinária Meire Ellen Mendes Silva, pela importante ajuda na confecção deste trabalho, muito grato pela sua disposição e presteza.

A Raquel Jesuíno, pelo auxílio e busca estatística nos arquivos do HV-UFU. Sem esses dados o trabalho não seria realizado!

A todos os profissionais do HV, sempre solícitos e prontos pra ajudar.

A Universidade Federal de Uberlândia que me permitiu concluir todos os estágios de minha formação, desde a graduação até este momento na conclusão do doutorado.

Ao Hospital Veterinário da UFU, Amado Junior, Vânia Amaral que me acolheram, acreditaram e permitiram que desempenhasse minha profissão e aperfeiçoasse meus conhecimentos.

Aos professores e profissionais da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV).

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFU por proporcionar minha qualificação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa.

Aos professores que aceitaram compor esta banca de defesa, Dr. João Paulo Elsen Saut, Dr. Antonio Vicente Mundim, Dr. Fernando Antônio Ferreira, Dr. Matheus Mاتيoli Mantovani, Dra. Eneida César Mastrantonio. Obrigado por se disponibilizarem a realizar a leitura, correções e avaliação deste trabalho.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, obrigado!

RESUMO

Os cães atualmente são um dos mais importantes animais de estimação no mundo, tendo relevância como animais de companhia, guarda, pesquisa e reprodução, dentre outras. Com isso, aumenta a demanda por novos estudos sobre a espécie, principalmente no que diz respeito às doenças uterinas, comuns nos animais e importantes por causarem infertilidade, aborto, trabalho de parto prematuro e doença clínica. As doenças uterinas mais frequentemente encontradas em fêmeas não gestantes são a piometra e a hiperplasia endometrial cística, portanto objetivou-se no primeiro artigo, determinar a casuística das enfermidades reprodutivas de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, durante seis anos de avaliação (2012-2017), a fim de identificar quais enfermidades são mais frequentes. Para tanto, foram consultadas informações sobre espécie, idade, raça e sexo de 32.944 animais. Destes, 16.480 eram fêmeas caninas e 1.185 foram diagnosticadas com alterações no sistema reprodutivo. Os animais foram divididos de acordo com a idade em quatro grupos (filhotes, adultos jovens, adultos e idosos); e com as enfermidades do sistema reprodutivo (Grupo 1 – alterações de vagina e vulva; Grupo 2 – alterações de ciclo estral, ovário e útero; Grupo 3 – alterações do período gestacional e parto). A taxa de alterações reprodutivas na população estudada foi de 7,2%, onde as médias de idades que apresentaram maior ocorrência de diagnósticos foram em cadelas adultas jovens (1 a 5 anos) com 47%. As patologias mais frequentes em fêmeas caninas foram a piometra (48,8%), distocias (13,6%) e Tumor Venéreo Transmissível (TVT) (12,6%). Os animais mestiços (SRD) foram os mais acometidos por distúrbios do sistema reprodutor, representando 60% do total de fêmeas diagnosticadas. Diante desses dados, o segundo artigo objetivou avaliar o efeito da inflamação sobre a produção das interleucinas 6 (IL6) e 12 (IL12) em culturas de endométrios caninos *ex vivo* desafiadas com LPS. Para o estudo, foram coletados úteros de 42 fêmeas caninas saudáveis submetidas a ovariossalpingohisterectomia (OSH) eletiva, de onde retirou-se explantes que foram submetidos a tratamento com controle, LPS, dexametasona, LPS + dexametasona, sendo então mensurados os valores de IL-6 e IL-12 pelo método de ELISA. Os explantes foram classificados histopatologicamente quanto ao tipo de inflamação em, sem inflamação, inflamação aguda, inflamação sub-aguda e inflamação crônica. Os resultados revelaram que o desafio com LPS não desencadeou síntese significativa de IL12 e principalmente de IL6 nas culturas de amostras de endométrios inflamados, indicando que cadelas com infiltrado inflamatório no endométrio podem apresentar comprometimento da resposta imune inata uterina.

Palavras-chave: Piometra, hiperplasia endometrial cística, ocorrência, citocinas, IL-6, IL-12, explantes, imunidade uterina.

ABSTRACT

Dogs are currently one of the most important pets in the world, having relevance as pet animals, guard, research and breeding, among others. This increases the demand for new studies on the species, especially regarding uterine diseases, common in animals and important for causing infertility, abortion, preterm labor and clinical disease. The uterine diseases most frequently found in non-pregnant females are pyometra and cystic endometrial hyperplasia, so it was objectified in the first article to determine the casuistry of the reproductive diseases of bitches attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Uberlândia, during six years of evaluation (2012-2017) in order to identify which diseases are most frequent. For this purpose, information on species, age, race and sex of 32.944 animals was consulted. Of these, 16.480 were female canines and 1.185 was diagnosed with alterations in the reproductive system. The animals were divided according to age in four groups (puppies, young adults, adults and elderly); (Group 1 - alterations of the vagina and vulva, Group 2 - alterations of estral cycle, ovary and uterus, Group 3 - alterations of the gestational period and childbirth). The rate of reproductive alterations in the study population was 7.2%, where the mean ages that presented the highest occurrence of diagnoses were in young adult bitches (1 to 5 years old) with 47%. The most frequent pathologies in canine females were pyometra (48.8%), dystocia (13.6%) and Transmissible Venereal Tumor (TVT) (12.6%). Crossbred animals were the most affected by disturbances of the reproductive system, representing 60% of the total females diagnosed. According to these data, the second article aimed to evaluate the effect of inflammation on the production of interleukins 6 (IL6) and 12 (IL12) in cultures of canine endometrial ex vivo challenged with LPS. For the study, 42 healthy canine females submitted to elective ovariosalpingohysterectomy (OSH) were collected from which explants that were submitted to treatment with control, LPS, dexamethasone, LPS + dexamethasone were collected, and the values of IL-6 and IL-12 by the ELISA method. Explants were classified histopathologically as to the type of inflammation in, without inflammation, acute inflammation, sub-acute inflammation and chronic inflammation. The results revealed that the challenge with LPS did not trigger significant synthesis of IL12 and mainly IL6 in cultures of inflamed endometrial samples, indicating that bitches with inflammatory infiltrate in the endometrium may present impaired innate immune response.

Key words: Pyometra, cystic endometrial hyperplasia, occurrence, cytokines, IL-6, IL-12, explants, uterine immunity.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Ocorrência de desordens reprodutivas em cadelas atendidas no hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (2012-2017). 37
- Tabela 2.** Distribuição dos diagnósticos por grupos de desordens reprodutivas em cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (2012-2017). 39

CAPÍTULO 3

- Tabela 1.** Resposta das interleucinas 6 e 12 (pg/mg) de culturas de endométrio canino *ex vivo* com diferentes graus de inflamação frente à exposição ao lipopolissacarídeo e à dexametasona durante 24 horas. 56

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- | | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1. | Distribuição da ocorrência de desordens reprodutivas de acordo com a raça das cadelas atendidas no hospital veterinário da universidade Federal de Uberlândia (2012-2017). | 37 |
| Figura 2. | Ocorrência de desordens reprodutivas por grupos segundo a faixa etária de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (2012-2017). | 38 |
| Figura 3. | Ocorrência de desordens reprodutivas segundo a faixa etária de cadelas atendidas no hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (2012-2017). | 40 |

CAPÍTULO 3

- | | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1. | Apresentação esquemática das etapas do experimento e dos grupos experimentais. | 50 |
| Figura 2. | Resposta da interleucina 6 de culturas de endométrio canino <i>ex vivo</i> com diferentes graus de inflamação frente à exposição ao lipopolissacarídeo e à dexametasona durante 24 horas. | 57 |
| Figura 3. | Resposta da interleucina 6 de culturas de endométrio canino <i>ex vivo</i> com diferentes graus de inflamação frente à exposição ao lipopolissacarídeo e à dexametasona durante 24 horas. | 58 |

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Importantes afecções uterinas relacionadas à inflamação	17
2.1.1 Endometrite	17
2.1.2 Complexo hiperplasia endometrial cística-piometra	18
2.2 Aspectos gerais de imunologia	20
2.3 Inflamação	22
2.3.1 Resposta inflamatória aguda, sub-aguda e crônica	24
2.3.2 Cascata da inflamação	24
2.3.3 Síndrome da resposta inflamatória sistêmica e sepse	25
2.4 Imunidade e morfologia do útero	26
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
 CAPÍTULO 2 – Estudo retrospectivo de desordens reprodutivas em cadela no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil	 34
Abstract/Resumo	35
Introdução	36
Material e Métodos	36
Resultados	37
Discussão	40
Conclusão	41
Referências	42

CAPÍTULO 3 – Efeito da inflamação sobre a produção de interleucinas 6 e 12 em culturas de endométrios caninos ex-vivo tratadas com lipopolissacarídeo.	44
--	----

Resumo	45
Abstract	46
Introdução	47
Materiais e métodos	49
Animais e coleta de amostras	49
Delineamento experimental	49
Processamento das amostras	50
Realização do ELISA	51
Avaliação histopatológica	52
Análise estatística	54
Resultados	55
Resultados referentes ao histórico das cadelas	55
Resultados referentes à avaliação histopatológica das amostras	55
Resultados referentes ao ELISA	56
Discussão	59
Conclusão	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ANEXOS

Anexo A – Normas de publicação revista Bioscience Journal	69
---	----

CAPÍTULO 1
CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 - INTRODUÇÃO

Os cães atualmente são um dos mais importantes animais de estimação no mundo, tendo relevância como animais de companhia, guarda, pesquisa e reprodução, dentre outras. Segundo dados do IBGE (2013), estima-se que no mundo existam cerca de 360,8 milhões de cães, sendo que no Brasil, segundo lugar no mundo em número de cães, esse número seria de 52,2 milhões, fazendo aumentar a demanda por novos estudos sobre a espécie, principalmente no que diz respeito às doenças uterinas, causa de grande parte de perdas de animais para reprodução.

As enfermidades nos órgãos reprodutivos das cadelas têm variados graus de morbidade e mortalidade, sofrendo influências do histórico reprodutivo, de tratamentos farmacológicos prévios e de condições ambientais, podendo assim haver variações regionais na incidência de determinadas anormalidades reprodutivas (PREVIATO et al., 2005)

As infecções do útero são comuns nos animais, e infecções uterinas são importantes porque elas causam infertilidade, aborto, trabalho de parto prematuro e doença clínica (WIRA et al. 2005; JABBOUR et al. 2009; MOR; CARDENAS, 2010), sendo que a homeostase do trato genital feminino é constantemente desafiada por diversos eventos fisiológicos durante os ciclos reprodutivos, tornando essas infecções a que estão expostas, um problema de saúde mundial em animais (SHELDON; OWENS; TURNER, 2017).

A necessidade de diagnosticar adequadamente as doenças reprodutivas se faz iminente, uma vez que o diagnóstico precoce da enfermidade uterina é importante no sentido de preservar a vida do animal, iniciando precocemente o tratamento e impedindo o desenvolvimento dos efeitos potencialmente letais da doença. As doenças uterinas mais frequentemente encontradas em fêmeas não gestantes são a piometra e a hiperplasia endometrial cística (HEC) (JITPEAN et al., 2012; MOXON; WHITESIDE; ENGLAND, 2016) e podem estar associadas à inflamação, infecção ou outros fatores etiológicos desconhecidos (HAGMAN, 2017). Júnior et al., (2011) observaram a prevalência de 7,65% de desordens reprodutivas em animais atendidos no Ambulatório Veterinário da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul – Brasil. Em estudo semelhante, Montenegro (2010) encontrou 52% de incidência de piometra nas cadelas estudadas, sendo que a média de idade era de $8,6 \pm 3,4$ anos, assim como Hagman (2018) que encontrou a piometra afetando mais cadelas de meia idade a idosas, não castradas,

normalmente 4 meses após o estro. Já a HEC segundo Hagman et al. (2006) e Johnston et al. (2001) relatam, ocorre com maior frequência em fêmeas com idade média de 8 anos ou em fêmeas que passaram por tratamentos com progestágenos.

Essas alterações reprodutivas podem apresentar consequências variadas, que se estendem da ausência de sinais clínicos, comprometendo somente a fertilidade do animal e passando despercebidas ao proprietário, até manifestações clínicas agudas, que podem conduzir à morte, como nos casos de piometra. Essas alterações, portanto, quando detectadas tardiamente podem comprometer a vida dos animais, refletindo em perdas emocionais para seus proprietários (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

A identificação de biomarcadores adequados para o diagnóstico das doenças uterinas é importante, pois diferenciaria o distúrbio uterino, e ainda determinaria a necessidade de uso de antimicrobianos, ou não, onde a infecção bacteriana estiver presente ou ausente (WEDLEY et al., 2017), além do que, entendendo como a inflamação no útero é regulada, podem ser desenvolvidos tratamentos mais eficazes para as patologias uterinas (SHELDON; ROBERTS, 2010).

2 - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importantes afecções uterinas relacionadas à inflamação

2.1.1 Endometrite

Em cadelas, algumas afecções do útero representam grande importância clínica, uma vez que podem levar à subfertilidade ou infertilidade, provocar sinais sistêmicos ou mesmo colocar em risco a vida do animal. Dentre essas afecções destacam-se a endometrite, a piometra e a Hiperplasia Endometrial Cística (HEC) (PREVIATO et al., 2005; GIFFORD; SCARLETT; SCHLAFER, 2014).

A endometrite em cadelas ainda é pouco estudada e sua relação com a falha na concepção ainda não está elucidada. Sabe-se que a endometrite pode ser induzida pela cópula ou pela inseminação (FREEMAN; GREEN; ENGLAND, 2013) e tem origem bacteriana na maioria dos casos, sendo definida como a inflamação da mucosa uterina

que não se estende além do estrato esponjoso e histologicamente caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório, congestão vascular, edema estromal e acúmulo de linfócitos e plasmócitos nas camadas superiores do endométrio (FONTAINE et al., 2009).

No início da infecção bacteriana uterina observa-se infiltrado inflamatório neutrofílico envolvendo a camada superficial do endométrio, acompanhado de congestão vascular e edema subjacente ao epitélio luminal, o qual frequentemente encontra-se irregular e em casos graves pode estar ulcerado. Os neutrófilos também podem ser encontrados em capilares do estrato compacto, migrando entre as células epiteliais do lúmen, e no fluido que recobre o lúmen uterino. Em infecções brandas pode haver pouco ou nenhum infiltrado neutrofílico na porção mais profunda do endométrio (SCHLAFER, 2012).

Na endometrite subaguda observa-se presença de infiltrado inflamatório misto, contendo tanto células polimorfonucleares quanto células mononucleares. Já na endometrite crônica a composição celular do infiltrado inflamatório passa a incluir predominantemente linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Sua distribuição se estende até a camada mais profunda do endométrio e eventualmente alcança o miométrio. Além disso, pode haver fibrose intersticial leve (SCHLAFER, 2012; GIFFORD; SCARLETT; SCHLAFER, 2014).

2.1.2 Complexo Hiperplasia Endometrial Cística-Piometra

A HEC é caracterizada pela formação de cistos no endométrio (SCHLAFER; GIFFORD, 2008) devido a uma resposta exagerada do útero a estímulos crônicos ou repetidos pela progesterona (P4), durante a fase lútea do ciclo estral (DE BOSSCHERE et al., 2001).

Nos casos de HEC, o endométrio é mais espesso devido ao aumento do tamanho e número das glândulas endometriais. Assim, as glândulas endometriais hipertróficas e hiperplásicas têm sua atividade secretória elevada e um fluido estéril acumula-se no lúmen do útero, resultando em mucometra ou hidrometra, conforme a viscosidade desse conteúdo (FAYRER-HOSKENS et al., 1992; FELDMAN; NELSON, 1996).

Segundo Barton (1992), mucometra é a HEC avançada, em que há atrofia das paredes uterinas e lúmen uterino preenchido por muco. A HEC pode ainda ser

categorizada de leve à grave, conforme o número de cistos e a porcentagem do útero afetada (DE BOSSCHERE et al., 2001; CRANE; KUTZLER, 2014).

Acredita-se que a quantidade excessiva de fluidos acumulados no lúmen uterino, a presença de inúmeras criptas e cistos em que as bactérias conseguem se proliferar, bem como a reduzida imunidade local associada à degeneração tecidual favorece o estabelecimento de infecção no útero (VERSTEGEN; DHALIWAL; VERSTEGEN-ONCLIN, 2008).

Sendo assim, a HEC é considerada a fase inicial do que passou a ser denominado Complexo Hiperplasia Endometrial Cística-Piometra, conforme proposto por Dow (1959). Entretanto, sabe-se que nem todas as cadelas com HEC desenvolvem piometra, assim como nem todas as cadelas diagnosticadas com piometra apresentam HEC, portanto, não se pode afirmar com certeza que a HEC desencadeia a piometra (VERSTEGEN; DHALIWAL; VERSTEGEN-ONCLIN, 2008).

Piometra é o termo utilizado para denominar a infecção uterina em que ocorre acúmulo de conteúdo purulento no lúmen do útero (DOW, 1959). Esta doença acomete cadelas inteiras, sexualmente maduras e é frequentemente diagnosticada entre quatro semanas e quatro meses após o estro. Clinicamente o animal pode apresentar sinais como depressão, inapetência, letargia, polidipsia e distensão abdominal. Descarga vaginal pode estar presente se a cérvix estiver aberta, porém se a cérvix estiver fechada a secreção não é exteriorizada e o quadro torna-se ainda mais grave, consistindo em emergência que requer rápida intervenção (SMITH, 2006).

Isso acontece porque a piometra é predominantemente causada por bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli* (DE BOSSCHERE et al., 2001; HAGMAN et al., 2006) que liberam endotoxinas na circulação sanguínea, levando à produção de diversos mediadores inflamatórios responsáveis por vários sinais sistêmicos, incluindo alterações hematológicas (HAGMAN et al., 2006). Ademais, piometra também está associada à ocorrência da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) e sepse, sendo uma afecção que coloca em risco a vida das cadelas acometidas e, portanto, exige cuidados intensivos e imediatos (HAGMAN, 2017; KARLSSON et al., 2012).

Muitos estudos têm sido realizados a fim de elucidar a real associação entre essas afecções reprodutivas e compreender de que forma elas interferem na resposta imune inata uterina de cadelas. Hagman, Rönnberg e Pejler (2009) encontraram maior

expressão dos genes *IL1*, *IL6*, *IL8* e outras citocinas no útero de cadelas com piometra, o que também foi observado por Bukowoska et al. (2014) e Voorwald et al. (2015). Contudo, esse aumento da expressão gênica não se restringe às citocinas, pois inclui também proteínas quimiotáticas da família S100, prostaglandinas, cicloxigenases e receptores *toll-like* (HAGMAN; RÖNNBERG; PEJLER, 2009; BUKOWSKA et al., 2014; VOORWALD et al., 2015). Sendo assim, já se sabe que, uma vez estabelecida a piometra, ocorre o aumento da expressão de diversos genes relacionados à resposta imune inata e adaptativa, elevando a síntese de mediadores inflamatórios na tentativa de combater o processo infeccioso. No entanto, ainda é necessário investigar de maneira mais aprofundada o perfil de produção e expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no útero de cadelas clinicamente saudáveis, a fim de compreender quais são as características predisponentes ao estabelecimento da piometra, de forma a contribuir para o diagnóstico precoce dessa patologia.

2.2 - Aspectos gerais de imunologia

O sistema imune é responsável por detectar e eliminar patógenos invasores, uma vez que consegue discriminar o que é ou não próprio do organismo. Nos mamíferos, o sistema imune pode ser dividido em duas amplas categorias, a imunidade inata e a imunidade adaptativa (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). A resposta imune inata se diferencia da adaptativa pelas células envolvidas, dentre elas macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células *natural killer* (NK) e células epiteliais, bem como pelo tipo e especificidade de receptores para antígenos, pela natureza da resposta aos antígenos e por ser imediata (WIRA et al., 2005).

A imunidade adaptativa detecta moléculas não-próprias mediante o reconhecimento de antígenos por receptores presentes na superfície de linfócitos T e B (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003) e atua de forma específica contra os patógenos. Após a apresentação de antígenos, realizada pelas células apresentadoras de antígenos, ocorre a ativação dos linfócitos que passam, então, a executar suas funções de produção de citocinas, citotoxicidade e síntese de anticorpos (WIRA et al., 2005).

Já a imunidade inata é a defesa não-específica contra microrganismos, e inclui barreiras da pele e mucosas, peptídeos antimicrobianos, sistema complemento e células que apresentam receptores de reconhecimento de padrões (PRR), os quais detectam

patógenos ao identificarem moléculas microbianas denominadas *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (TURNER; HEALEY; SHELDON, 2012).

Os receptores *toll-like* (TLRs) são exemplos de PRR e encontram-se expressos em macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células NK e células epiteliais (WIRA et al., 2005). Os TLRs estão no topo da cascata da resposta imune inata e consistem no elo mais importante entre os hospedeiros mamíferos e os microrganismos (BEUTLER et al., 2003), o que os torna alvo de frequentes estudos em diversas espécies. Existem vários tipos de TLR, sendo que cada um é capaz de reconhecer determinado PAMP, porém o TLR4 destaca-se por ter sido o primeiro a ser identificado em mamíferos e sabe-se que ele está envolvido no reconhecimento do lipopolissacarídeo (LPS) (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003).

O LPS é o principal glicopeptídeo que compõe a membrana externa de bactérias Gram-negativas e, portanto, tem capacidade de reproduzir muitas características de uma autêntica infecção por bactérias Gram-negativas (BEUTLER et al., 2003). Quando o LPS se liga ao complexo receptor constituído por TLR4, CD14 e MD-2, ocorre a ativação de vias de sinalização, gerando uma resposta inflamatória que inclui a liberação de citocinas e quimiocinas (SHELDON; ROBERTS, 2010).

Citocinas são mensageiros biológicos extremamente potentes e são denominadas de diferentes maneiras, dependendo da sua origem e da sua função na comunicação entre células. Interleucinas, interferons e fatores de crescimento são exemplos de citocinas (BÜTTNER et al., 1998). Neste estudo será dado maior enfoque às interleucinas, em especial à interleucina 6 (IL6) e à interleucina 12 (IL12), ambas produzidas e liberadas após a ligação do LPS ao complexo receptor TLR4, CD14 e MD-2.

As interleucinas são citocinas que medeiam a sinalização entre linfócitos e outros leucócitos (TIZARD, 2009). A IL6 é uma interleucina pró-inflamatória que atua nas respostas imunes inata e adaptativa como um importante marcador inflamatório envolvido em diversas atividades imunológicas, incluindo a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado (GOMES; NETO; BISPO, 2009). Tem sido sugerido que a IL6 regula a transição da fase que é predominantemente marcada pela presença de neutrófilos, no início do processo inflamatório, para a fase inflamatória mais tardia, em que os macrófagos são dominantes (TIZARD, 2009).

A síntese de IL6 ocorre em monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta às endotoxinas de microrganismos ou ao estímulo de outras citocinas, como interleucina 1 (IL1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Tanto a IL6 quanto seu receptor (gp130) são expressos em baixos níveis no estado fisiológico, porém, quando há infecção, trauma ou outro estímulo estressante, passam a ser amplamente expressos (GOMES; NETO; BISPO, 2009). Além disso, estudos revelam concentrações significativamente elevadas de IL6 no plasma de humanos e cães em sepse, sendo que essa interleucina apresenta maior meia-vida plasmática que o TNF- α e a IL1 β (RAU et al., 2007).

A IL12 é uma citocina heterodimérica 70-kDa (p70) composta por duas subunidades covalentemente ligadas, a subunidade 40-kDa (p40) e a subunidade 35-kDa (p35). Trata-se de uma interleucina pró-inflamatória produzida por diferentes células, como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, em resposta a produtos bacterianos, bactérias vivas ou mortas pelo calor ou ainda a patógenos intracelulares (HEUFLER et al., 1996). Ela age como um regulador da resposta imune mediada por células ao induzir a diferenciação de linfócitos T helper 1. Ademais, estimula a produção de interferon gama (IFN- γ), promove proliferação e atividade citolítica das células NK e linfócitos T, influencia no crescimento e maturação de células hematopoiéticas, e tem ação imunomoduladora e antiangiogênica (DEL VECCHIO et al., 2007). Tendo em vista seu papel central e múltiplo na resposta imune, a IL12 tem sido bastante estudada.

2.3 - Inflamação

2.3.1 - Resposta inflamatória aguda, subaguda e crônica

A inflamação é desencadeada por diferentes tipos de injúrias teciduais, induzindo sinais locais característicos, como hiperemia, edema, dor e hipertermia. Em tecidos inflamados há abundante infiltração de células inflamatórias como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, sendo o recrutamento dessas células realizado principalmente pela expressão de quimiocinas (AOKI; NARUMIYA, 2012).

A resposta inflamatória aguda inicia-se rapidamente após um dano tecidual, torna-se severa em curto intervalo de tempo e seus sintomas duram poucos dias. A inflamação

subaguda corresponde ao período entre a inflamação aguda e a crônica, durando de duas a seis semanas. Já a inflamação crônica é definida como uma inflamação lenta, de longa duração que persiste por meses a anos (PAHWA; JIALAL, 2018).

A resposta inflamatória aguda imediata é basicamente a mesma, independentemente do agente causador. Ela é desencadeada por uma série de mediadores químicos que são produzidos rapidamente e agem primeiramente na microcirculação, causando exsudação de fluido e de células leucocitárias sanguíneas, principalmente as polimorfonucleares, como os neutrófilos. A resposta aguda tem como principal característica o fato de ser provocada por qualquer agente que cause injúria. Já a resposta crônica responde diferentemente a cada tipo de agente, sendo que substâncias antigênicas levam ao predomínio de linfócitos e plasmócitos, enquanto que agentes não antigênicos, como lipídeos ou corpos estranhos insolúveis, geram predomínio de macrófagos (RYAN; MAJNO, 1977).

Frequentemente a inflamação aguda persiste e se torna crônica, contudo, em alguns casos a inflamação crônica é uma resposta independente e não sequencial à inflamação aguda. A extensão dos efeitos da inflamação crônica varia conforme a causa da injúria e a habilidade do organismo de reparar e superar o dano (PAHWA; JIALAL, 2018). Os mecanismos que contribuem para a inflamação crônica incluem: conversão da inflamação aguda em inflamação de longa duração; ativação de feedback positivo por estímulos repetitivos; manutenção da inflamação por mudanças na população de células ativadas nos tecidos acometidos; e remodelamento tecidual (AOKI; NARUMIYA, 2012).

A maioria das características da inflamação aguda persiste na inflamação crônica, como a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade capilar, porém, o tipo de leucócito que migra para o tecido acometido muda à medida que macrófagos e linfócitos substituem os neutrófilos. A produção de citocinas, fatores de crescimento e enzimas por essas células inflamatórias contribui para a progressão do dano tecidual e para o reparo secundário, como fibrose e formação de granuloma (PAHWA; JIALAL, 2018).

A inflamação crônica pode ser proliferativa não-específica, caracterizada pela presença de tecido de granulação não específico, constituído por infiltrado de células mononucleares (linfócitos, macrófagos e células plasmáticas) e pela proliferação de fibroblastos, tecido conectivo, vasos e células epiteliais. Além disso, ela pode ser granulomatosa, quando há presença de lesões nodulares ou formação de granuloma com

a agregação de macrófagos ativados ou células epitelióides, que podem coalescer e formar células gigantes, circundadas por linfócitos (PAHWA; JIALAL, 2018).

Apesar de associar-se resposta aguda com polimorfonucleares e resposta crônica com mononucleares, as duas podem ocorrer de forma sobreposta (RYAN; MAJNO, 1977). A transição de infiltrado neutrofílico para infiltrado mononuclear no local inflamado sugere a progressão de eventos que levam não apenas ao recrutamento de monócitos, mas também ao desaparecimento de neutrófilos (GABAY, 2006). Essa transição consiste na inflamação subaguda, caracterizada pela presença infiltrado inflamatório misto no local inflamado.

Ademais, é importante destacar que quando se compara os termos clínicos e histológicos de inflamação aguda e crônica percebe-se que os eventos histológicos evoluem em maior velocidade que os clínicos. Portanto, uma resposta inflamatória aguda pode ser observada histologicamente antes do aparecimento de sinais clínicos e, após alguns dias, quando houver quadro clínico agudo, a avaliação histológica do local acometido já apresentará características de inflamação crônica (RYAN; MAJNO, 1977).

2.3.2 Cascata da inflamação

Citocinas são altamente ativas em concentrações muito baixas e combinam-se com elevada afinidade a poucos receptores presentes na superfície das células, gerando mudanças nos padrões de síntese de RNA e proteínas. Elas têm múltiplos efeitos no crescimento e diferenciação de vários tipos celulares, sendo que há grande sobreposição e redundância entre elas. Suas ações específicas dependem do estímulo, do tipo de célula e da presença de outros mediadores e receptores (GALLEY; WEBSTER, 1996).

A presença de endotoxina ou LPS na circulação sanguínea é observada em diversos casos de infecção e desencadeia a resposta imune inata, levando à produção dos mediadores pró-inflamatórios primários: IL1 e TNF (GALLEY; WEBSTER, 1996). A síntese de IL1 e TNF dá início à uma cascata inflamatória, levando à síntese de outros mediadores inflamatórios como a enzima ciclooxygenase 2 (COX-2), moléculas de adesão endotelial e quimiocinas que por sua vez desencadeiam a liberação de prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico, por exemplo, além de promoverem a ativação e migração de neutrófilos. A ocorrência desses eventos estabelece um quadro de inflamação que pode levar à destruição dos tecidos e perda de função dos mesmos (DINARELLO, 2000).

Concomitantemente à produção de mediadores pró-inflamatórios deve haver a síntese de mediadores anti-inflamatórios, como as interleucinas 4 (IL4) e 10 (IL10), que garantam o equilíbrio da resposta inflamatória, já que a exposição sistêmica prolongada a altas concentrações de citocinas e outros componentes da cascata inflamatória pode contribuir para o desenvolvimento da síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (GALLEY; WEBSTER, 1996; DINARELLO, 2000).

A resposta inflamatória pode tornar-se desequilibrada devido à ocorrência de novas injúrias enquanto uma injúria inicial ainda não foi resolvida ou em razão de um sistema imunológico comprometido. Quando isso ocorre, a inflamação local progride para uma resposta inflamatória sistêmica (BRADY; OTTO, 2001).

2.3.3 - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica e sepse

O termo Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) é utilizado para descrever a reação inflamatória desencadeada pelo organismo frente a qualquer agressão, seja ela infecciosa ou não-infecciosa. A denominação Sepse é dada à resposta inflamatória sistêmica do organismo frente a um estímulo necessariamente infeccioso e requer a presença de alguns sinais clínicos para o diagnóstico, sendo que a sepse grave está associada a disfunção orgânica, hipotensão ou hipoperfusão. Já a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos é caracterizada pela presença de função orgânica alterada em pacientes gravemente doentes, não sendo possível manter a homeostase sem intervenção (SALLES et al., 1999).

Alguns sinais clínicos observados em animais com SIRS ou sepse são: taquicardia, taquipneia, hipertermia, vasodilatação periférica e aumento da permeabilidade vascular. Na espécie canina, a sepse é frequentemente associada a casos de peritonite, piometra, pielonefrite, pneumonia e endocardite. Ademais, a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos apresenta sinais de comprometimento pulmonar e gastroentérico como primeiras manifestações clínicas (BRADY; OTTO, 2001).

A SIRS e a sepse podem ser causadas por qualquer agente infeccioso, como bactérias, fungos, protozoários e vírus, porém a SIRS pode ser provocada por causas não infecciosas, como trauma, insolação e neoplasia. Entretanto, bactérias entéricas Gram-negativas são descritas na literatura veterinária como a principal causa de sepse, sendo o LPS a molécula mais potente em estimular a liberação de mediadores pró-inflamatórios,

quando comparado à peptidoglicanos de bactérias Gram-positivas, por exemplo (BRADY; OTTO, 2001).

É importante destacar que estudos em animais e humanos revelaram a produção massiva de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL1 e IL6 em pacientes apresentando sepse, sendo a concentração plasmática de IL6 considerada um marcador válido para o prognóstico desses pacientes (RAU et al., 2007). Todavia, estudo realizado por Karlsson et al. (2012) detectou concentrações maiores de IL8 no soro de cadelas com piometra associada à SIRS, quando comparadas às de cadelas com piometra não associada a SIRS, enquanto as concentrações de IL4, IL6 e IFN- γ não foram detectadas em cadelas com piometra e SIRS.

2.4 - Imunidade e morfologia do útero

Os aspectos imunológicos abordados acima têm relevante aplicação à imunidade uterina de diversas espécies animais. Sabe-se que o trato reprodutivo feminino é frequentemente acometido por infecções associadas à cópula, à inseminação, à prenhez ou ao período pós-parto, o que desencadeia resposta inflamatória caracterizada pela produção de citocinas, quimiocinas e prostaglandinas (TURNER; HEALEY; SHELDON, 2012).

O útero, em especial o endométrio, pode ser infectado por microrganismos que chegam por via ascendente ou, nos casos de patógenos especificamente adaptados, por via hematogênica. A inflamação desencadeada por infecção ou dano tecidual é mediada por células do sistema imune inato, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, porém, células epiteliais e estromais também participam da resposta imune inata no endométrio de humanos e animais (SHELDON; OWENS; TURNER, 2017).

O útero das cadelas é um órgão composto por dois cornos, um corpo e um colo, sendo este último também denominado cérvix. A parede do útero é constituída por três camadas: serosa, denominada perimétrio; muscular, denominada miométrio; e mucosa, denominada endométrio. O perimétrio é a camada mais externa do útero, composta por tecido conjuntivo frouxo revestido externamente por mesotélio. O miométrio inclui o estrato vascular com vasos sanguíneos calibrosos entre as camadas interna (circular) e externa (longitudinal) de musculatura lisa, sendo que em cadelas multíparas encontra-se

fibras musculares dispostas em várias direções e estrato vascular evidente (MONTEIRO et al., 2009).

O endométrio é a camada mais interna do útero, voltada para o lúmen, e passa por mudanças morfológicas ao longo das fases do ciclo estral. No final do anestro, quando há aumento da secreção de estrógeno pelos folículos emergentes, inicia-se a primeira fase de crescimento endometrial, em que ocorre aumento da atividade mitótica das células epiteliais, a espessura do endométrio fica maior e os vasos sanguíneos dilatados. O segundo período de crescimento começa próximo à metade do estro e atinge seu pico no final do estro. Quando as concentrações de estrógeno e progesterona estão elevadas a superfície epitelial do endométrio sofre transformações e torna-se secretória, já quando a concentração de progesterona reduz, no final do diestro e início do anestro, ocorre a involução endometrial (GALABOVA et al., 2003).

Em estudo realizado por Monteiro et al. (2009) observaram que cadelas nulíparas apresentaram endométrio com pregueamentos longitudinais discretos, superfície recoberta por epitélio simples cúbico e lâmina própria de tecido conjuntivo em que se localizam as glândulas tubulares simples ramificadas constituídas por epitélio simples cúbico ou cilíndrico baixo. Já em cadelas múltíparas, o endométrio apresentou pregueamentos irregulares, superfície revestida por epitélio simples cilíndrico e lâmina própria contendo glândulas regulares recobertas por epitélio simples cilíndrico.

Além disso, Monteiro et al. (2009) também observaram que a espessura do endométrio de cadelas nulíparas é menor que a encontrada em cadelas múltíparas ou tratadas com contraceptivos e que a subcamada interna do miométrio de cadelas múltíparas ou tratadas com contraceptivos apresenta maior espessura que a de nulíparas.

3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, T.; NARUMIYA, S. Prostaglandins and chronic inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 6, p. 304–311, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.02.004>.

BARTON, C. Diseases of the uterus – Cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex. In: MORGAN RV. (ed) **Handbook of small animal practice**, 2. ed., New York: Churchill Livingstone, 1992; p. 655-658.

BEUTLER, B. et al. How we detect microbes and respond to them: The Toll-like receptors and their transducers. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 4, p. 479–485, 2003. <https://doi.org/10.1189/jlb.0203082>.

BRADY, C. A.; OTTO, C. M. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis and multiple organ dysfunction. **Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.**, v. 31, n. 6, p. 1147–1162, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(01\)50097-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(01)50097-2).

BUKOWSKA, D. et al. Microarray analysis of inflammatory response-related gene expression in the uteri of dogs with pyometra. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 28, n. 4, p. 637–648, 2014.

BÜTTNER, M. et al. Detection, cDNA cloning and sequencing of canine interleukin 12. **Cytokine**, v. 10, n. 4, p. 241–248, 1998. <https://doi.org/10.1006/cyto.1997.0284>.

CRANE, B.; KUTZLER, M.A. hiperplasia endometrial cística-piometra. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismo das Doenças em Cirurgia de Pequenos Animais**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 598-600.

DE BOSSCHERE, H. et al. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: Should the two entities be disconnected? **Theriogenology**, v. 55, n. 7, p. 1509–1519, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00498-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00498-8).

DEL VECCHIO, M. et al. Interleukin-12: Biological properties and clinical application. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 16, p. 4677–4685, 2007. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0776>.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503–508, 2000. <https://doi.org/10.1378/chest.118.2.503>.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of Comparative Pathology**, v. 69, n. 1, p. 237–252, 1959. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(59\)80023-0](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(59)80023-0).

FAYRER-HOSKENS, et al. Follicular cystic ovaries and cystic endometrial hyperplasia in a bitch. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 1, p.1992, 107-108, 1992.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. p. 608- 618. 766 p.

FONTAINE, E. et al. Diagnosis of endometritis in the bitch: A new approach. **Reprod Dom Anim**, v. 44, S2, p. 196–199, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01376.x>.

FREEMAN, S. L.; GREEN, M. J.; ENGLAND, G. C. W. Uterine fluid from bitches with mating-induced endometritis reduces the attachment of spermatozoa to the uterine epithelium. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 1, p. 76–80, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.06.026>.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2006. <https://doi.org/10.1186/ar1849>.

GALABOVA, G. et al. Morphological changes of the endometrial epithelium in the bitch during metoestrus and anoestrus. **Reprod Dom Anim**, v. 38, n. 5, p. 415–420, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00459.x>.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. F. The immuno-inflammatory cascade. **British Journal of Anaesthesia**, v. 77, n. 1, p. 11–16, 1996. <https://doi.org/10.1093/bja/77.1.11>.

GIFFORD, A. T.; SCARLETT, J. M.; SCHLAFFER, D. H. Histopathologic findings in uterine biopsy samples from subfertile bitches: 399 cases (1990-2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 2, p. 180–186, 2014. <https://doi.org/10.2460/javma.244.2.180>.

GOMES, M. A. M.; NETO, N. C. M.; BISPO, I. G. A. Interleucina-6, moléculas de adesão intercelular-1 e microalbuminúria na avaliação da lesão endotelial: Revisão de literatura. **Rev. SOCERJ**, v. 22, n. 6, p. 398–403, 2009.

HAGMAN, R. Molecular aspects of uterine diseases in dogs. **Reprod Dom Anim.**, v. 52, n. 3, p. 37–42, 2017. <https://doi.org/10.1111/rda.13039>.

HAGMAN, R. Pyometra in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 48, n. 4, p. 639–661, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.03.001>.

HAGMAN, R. et al. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2a metabolite analysis. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 198–206, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.11.002>.

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**, v. 4, n. 11, p. 1–14 e8039, 2009.

HEUFLER, C. et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- γ production by T helper 1 cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, n. 3, p. 659–668, 1996. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260323>.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) diretoria de pesquisas, coordenação de trabalho e rendimento: **Pesquisa nacional de saúde (2013)** Disponível em: <<ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>>. Acesso em: 02 de junho de 2015.

JABBOUR, H. N. et al. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. **Reproduction (Cambridge England)**, v. 138, n. 6, p. 903–919, dez. 2009. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0247>.

JITPEAN, S., HAGMAN, R., STRÖM HOLST, B., HÖGLUND, O. V., PETTERSSON, A., & EGENVALL, A. Breed variations in the incidence of pyometra and mammary tumours in Swedish dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, S6, p. 347–350, 2012. <https://doi.org/10.1111/rda.12103>.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V.; OLSON, P. N. Disorders of canine uterus and uterine tubes (oviducts). In: KERSEY, R. **Canine and Feline Theriogenology**. 1. ed. Philadelphia: Saunders Company, 2001. p. 206–224.

JUNIOR, A.S.R.; SILVA, T. Z.; RIBEIRO, E. M. R., SCHUCH, I. D.; CLEFF, M. B. (2011) Casuística do atendimento a pequenos animais no ambulatório veterinário – UFPEL. In: **38º CONBRAVET 2011**. Disponível em: <www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumo/990.pdf>. Acesso em: 26 maio 2015.

KARLSSON, I. et al. Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. **Reprod Dom Anim**, v. 47, S6, p. 337–341, 2012. <https://doi.org/10.1111/rda.12034>.

MONTEIRO, C. M. R. et al. Histologia e morfometria em cornos uterinos de cadelas nulíparas, múltiparas e tratadas com contraceptivos 1. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 10, p. 847–851, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009001000012>.

MONTENEGRO, L. M. F. **Estudo retrospectivo de urgências reprodutivas no Hospital Veterinário Montenegro**. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária)- Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, p. 63. 2010.

MOR, G.; CARDENAS, I. The immune system in pregnancy: A unique complexity. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 425–433, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x>.

MOXON, R.; WHITESIDE, H.; ENGLAND, G. C. W. Prevalence of ultrasound-determined cystic endometrial hyperplasia and the relationship with age in dogs. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 976–980, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.022>.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 137 p.

PAHWA, R; JIALAL, I. Chronic inflammation. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan- Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>> Acessado em: 18 jun. 2018.

PREVIATO, P.F.G.P.; NETO, A.P.; WERNER, P.R., ACCO, A., MOTA, M.F.; SILVA, A.V., FONSECA, J.F. Alterações morfológicas nos órgãos genitais de cães e gatos provenientes de Vilas Rurais da região de Umuarama-PR. **Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR**, v. 8, n. 2, p.105-110, 2005.

RAU, S. et al. Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 3, p. 253–260, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2007.tb00220.x>.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation: A review. **The American Journal of Pathology**, v. 86, n. 1, p. 183–276, 1977.

SALLES, M. J. C. et al. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis – revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 1, p. 86–92, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301999000100015>.

SCHLAFFER, D. H. Diseases of the canine uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, S6, p. 318–322, 2012. <https://doi.org/10.1111/rda.12064>.

SCHLAFFER, D. H.; GIFFORD, A. T. Cystic endometrial hyperplasia, pseudo-placental endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 349–358, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.041>.

SHELDON, I. M.; OWENS, S. E.; TURNER, M. L. Innate immunity and the sensing of infection, damage and danger in the female genital tract. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 119, p. 67–73, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.07.002>.

SHELDON, I. M.; ROBERTS, M. H. Toll-Like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–10 e12906, 2010.

SMITH, F. O. Canine pyometra. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 610–612, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.023>.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 335–376, 2003. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>.

TIZARD, I.R. **Veterinary Immunology: An introduction**. 8. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Elsevier, 2009. 574p.

TURNER, M. L.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Immunity and inflammation in the uterus microbial infection of the uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 402–409, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02104.x>.

VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERSTEGEN-ONCLIN, K. Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: Advances in treatment and assessment of future reproductive success. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 364–374, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.036>.

VOORWALD, F. A. et al. molecular expression profile reveals potential biomarkers and therapeutic targets in canine endometrial lesions. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–17 e0133894, 2015.

WEDLEY, A. L., DAWSON, S., MADDOX, T. W., COYNE, K. P., PINCHBECK, G. L., CLEGG, P.; WILLIAMS, N. J. (2017). Carriage of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dogs: Prevalence, associated risk factors and molecular characteristics. **Veterinary Microbiology**, v. 199, p. 23–30, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.017>.

WIRA, C. R. et al. Innate and adaptive immunity in female genital tract: Cellular responses and interactions. **Immunological reviews**, v. 206, n. 1, p. 306–335, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00287.x>.

CAPÍTULO 2

ESTUDO RETROSPECTIVO DE DESORDENS REPRODUTIVAS EM CADELAS NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA, MINAS GERAIS, BRASIL

Artigo a ser submetido no periódico

Bioscience Journal (ANEXO A)

RETROSPECTIVE STUDY OF REPRODUCTIVE DISORDERS IN BITCHES IN THE MUNICIPALITY OF UBERLÂNDIA, MINAS GERAIS, BRAZIL

ESTUDO RETROSPECTIVO DE DESORDENS REPRODUTIVAS EM CADELAS NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA, MINAS GERAIS, BRASIL

ABSTRACT

Diseases of the reproductive system are common, for both sexes, in the most varied species. In bitches these diseases have different degrees of morbidity and mortality and are influenced by environmental conditions, reproductive history and previous treatments with drugs. Reproductive pathologies may have different consequences, ranging from the absence of clinical signs to the impairment of the animal's fertility. The objective of this study was to determine the casuistry of the reproductive diseases of bitches attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Uberlândia, during a six-year evaluation (2012-2017), in order to identify which diseases are most frequent. For this purpose, information on species, age, race and sex of 32.944 animals was consulted. Of these, 16.480 were female canines and 1.185 were diagnosed with alterations in the reproductive system. The animals were divided according to age in four groups (puppies, young adults, adults and elderly); (Group 1 - alterations of the vagina and vulva, Group 2 - alterations of estral cycle, ovary and uterus, Group 3 - alterations of the gestational period and childbirth). The mean ages that presented the highest occurrence of diagnoses were in young adult bitches (1 to 5 years old) with 47%. The most frequent pathologies in canine females were pyometra (48,8%), dystocia (13,6%) and Transmissible Venereal Tumor (TVT) (12,6%). The rate of reproductive changes in the studied population was 7, 2%. Crossbred animals (SRD) were the most affected by disturbances of the reproductive system, representing 60% of the total females diagnosed.

Keywords: cystic endometrial hyperplasia, pyometra, bitches, TVT, occurrence.

RESUMO

Enfermidades do sistema reprodutor são comuns, para ambos os sexos, nas mais variadas espécies. Em cadelas estas doenças têm diferentes graus de morbidade e mortalidade e são influenciadas por condições ambientais, histórico reprodutivo e tratamentos prévios com fármacos. As patologias reprodutivas podem apresentar consequências diversas, que variam desde a ausência de sinais clínicos até o comprometimento da fertilidade do animal. Objetivou-se determinar a casuística das enfermidades reprodutivas de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, durante seis anos de avaliação (2012-2017), a fim de identificar quais enfermidades são mais frequentes. Para tanto, foram consultadas informações sobre espécie, idade, raça e sexo de 32.944 animais. Destes, 16.480 eram fêmeas caninas e 1.185 foram diagnosticadas com alterações no sistema reprodutivo. Os animais foram divididos de acordo com a idade em quatro grupos (filhotes, adultos jovens, adultos e idosos); e com as enfermidades do sistema reprodutivo (Grupo 1 – alterações de vagina e vulva; Grupo 2 – alterações de ciclo estral, ovário e útero; Grupo 3 – alterações do período gestacional e parto). As médias de idades que apresentaram maior ocorrência de diagnósticos foram em cadelas adultas jovens (1 a 5 anos) com 47%. As patologias mais frequentes em fêmeas caninas foram a piometra (48,8%), distocias (13,6%) e Tumor Venéreo Transmissível (TVT) (12,6%), sendo a taxa de alterações reprodutivas na população estudada de 7,2%. Os animais mestiços (SRD) foram os mais acometidos por distúrbios do sistema reprodutor, representando 60% do total de fêmeas diagnosticadas.

Palavras-chave: hiperplasia endometrial cística, piometra, cadelas, TVT, prevalência.

INTRODUÇÃO

As constantes mudanças na sociedade moderna, decorrentes da urbanização, a aproximação entre humanos e os animais de estimação, tornou-os componentes importantes nas relações sociais, cada vez mais exigindo a manutenção destes com padrões raciais adequados às várias práticas, quer sejam de companhia, esporte, caça e/ou guarda, bem como auxílio a deficientes e idosos. Sendo assim, a preservação da capacidade reprodutiva é, na maioria dos casos, de grande importância para essas espécies, tendo em vista, a genética e o valor zootécnico do animal em questão (BRITO FILHO, 2008; STALLIVIERI et al., 2013).

O Brasil é o segundo país no mundo com a maior população de cães, 52,2 milhões, atrás apenas dos EUA, e estima-se que 44,3% dos domicílios brasileiros possuam um cão. Segundo PNAD (Pesquisa Nacional de Amostra de Domicílios) há mais cães do que crianças em domicílios, sendo o total de crianças 44,9 milhões (IBGE, 2013).

Na medicina veterinária, enfermidades do sistema reprodutor são comuns, para ambos os sexos, nas mais variadas espécies. Em cadelas estas doenças têm diferentes graus de morbidade e mortalidade e são influenciadas por condições ambientais, histórico reprodutivo e tratamentos prévios com fármacos, apresentando assim variações regionais na prevalência de determinadas anormalidades reprodutivas (PREVIATO et al., 2005).

As patologias reprodutivas podem apresentar consequências diversas, que variam desde a ausência de sinais clínicos e o comprometimento da fertilidade do animal, até manifestações clínicas agudas, que podem levar ao óbito (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Dentre as principais alterações clínicas, se destacam nas fêmeas caninas, os distúrbios do ciclo estral (síndrome do ovário remanescente e pseudociese); os distúrbios da vagina e do útero (vaginite, torção uterina, hiperplasia endometrial cística e piometra); e distúrbios do parto e período pós-parto (distocia, agalactia, tetania puerperal, metrite e abortos) (NELSON; COUTO, 2015; BIDDLE; MACINTIRE, 2000).

Segundo o Fórum dos dirigentes de hospitais veterinários de instituições federais de ensino superior (FORDHOV, 2018) o Brasil possui cerca de 39 Hospitais Veterinários Universitários. Estudos envolvendo prevalência de doenças são importantes para se determinar a importância destas na saúde dos animais, bem como identificar os fatores de risco e nortear estudos futuros no intuito de estabelecer melhores condutas na abordagem diagnóstica e terapêutica destes pacientes.

Objetivou-se determinar a casuística das enfermidades reprodutivas de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, durante seis anos de avaliação (2012-2017).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram consultadas 32.944 fichas clínicas dos animais atendidos na rotina clínica do Setor de Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, referentes ao período compreendido entre janeiro de 2012 a dezembro de 2017.

Na avaliação retrospectiva das fichas clínicas dos animais, daquelas que apresentavam diagnósticos relacionados ao sistema reprodutor feminino foram coletados os dados referentes a espécie, idade, raça e sexo de cada animal. Neste estudo não foram incluídos animais diagnosticados com alterações de glândulas mamárias.

Os diagnósticos foram baseados na anamnese, exame físico geral, exame físico específico do sistema reprodutor e exames complementares, como a ultrassonografia, radiografia e exame citopatológico. Especificamente para o complexo hiperplasia endometrial cística (HEC) - piometra, hemometra e mucometra, eram preconizados os seguintes exames complementares: hemograma completo, creatinina sérica e ultrassonografia abdominal (FRANSSON; RANGLE, 2003; HAGMAN et al., 2006; SMITH, 2006). O diagnóstico de tumor venéreo transmissível (TVT) foi determinado por exame físico, através da inspeção do tumor na genitália, por meio de exames citopatológicos como impressão sobre lâmina de microscopia (*imprint*) e citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) (WILLARD et al., 2011).

Os animais foram agrupados em quatro grupos em relação à idade, sendo: filhotes (menos de um ano), adultos jovens (de um a cinco anos), adultos (de seis a nove anos) e idosos (acima de nove anos). Quanto às enfermidades diagnosticadas, os animais foram divididos em três grupos: Grupo 1 – alterações de vagina e vulva; Grupo 2 – alterações de ciclo estral, ovário e útero; Grupo 3 – alterações do período gestacional e parto (BRITO FILHO, 2008). Os dados obtidos foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel 2010 e submetidos à análise estatística descritiva.

RESULTADOS

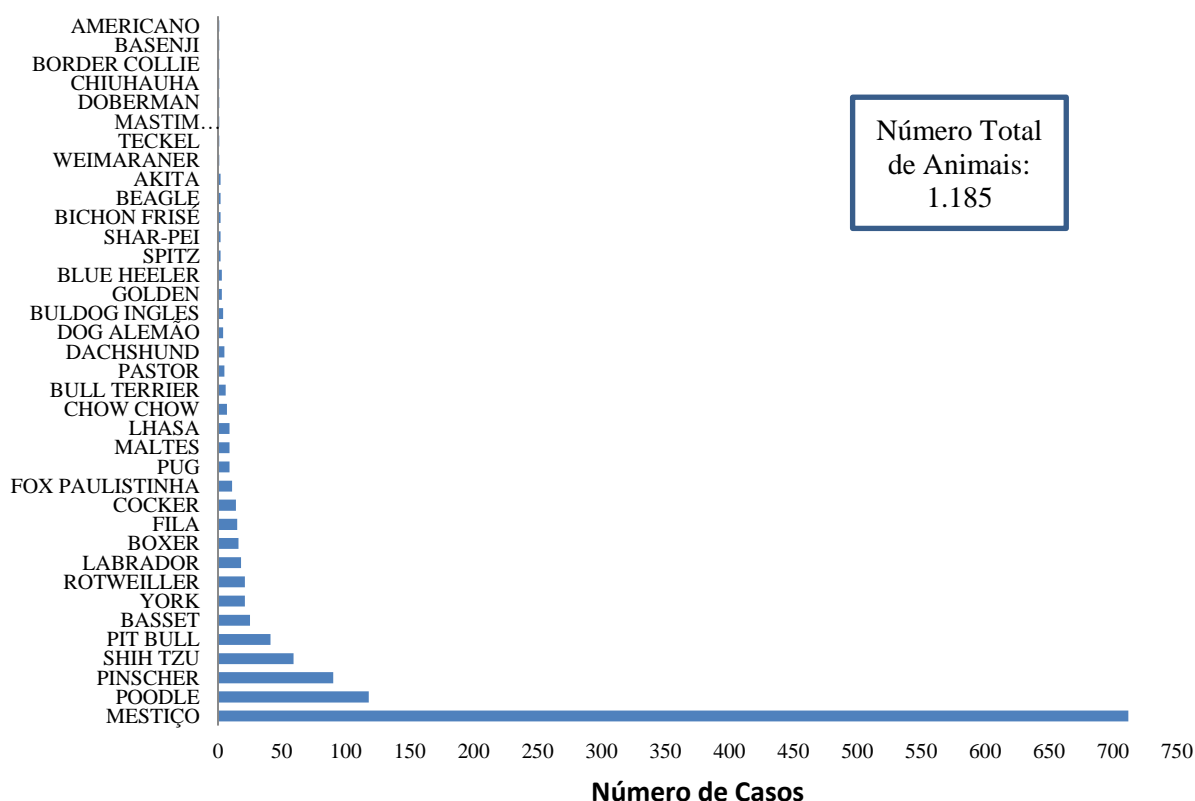
Nos seis anos de avaliação (2012-2017) foram computados os atendimentos de 32.944 animais, sendo 84,9% ($n=27.973$) cães e destes, 58,9% ($n=16.480$) fêmeas caninas. Do total de cadelas, em 7,2% ($1.185/16.480$) diagnosticaram-se enfermidades no sistema reprodutor. Foram observadas variações nas ocorrências anuais de desordens reprodutivas nas cadelas quando agrupadas, sendo a maior no ano de 2013 (Tabela 1).

Tabela 1 – Ocorrência de desordens reprodutivas em cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (2012-2017).

Cadelas com desordens reprodutivas						
	2012 %(n)	2013 %(n)	2014 %(n)	2015 %(n)	2016 %(n)	2017 %(n)
Cadelas	7,04% (179/2.540)	9,02% (268/2.969)	6,06% (183/3.018)	7,15% (185/2.586)	7,57% (215/2.840)	6,13% (155/2.527)

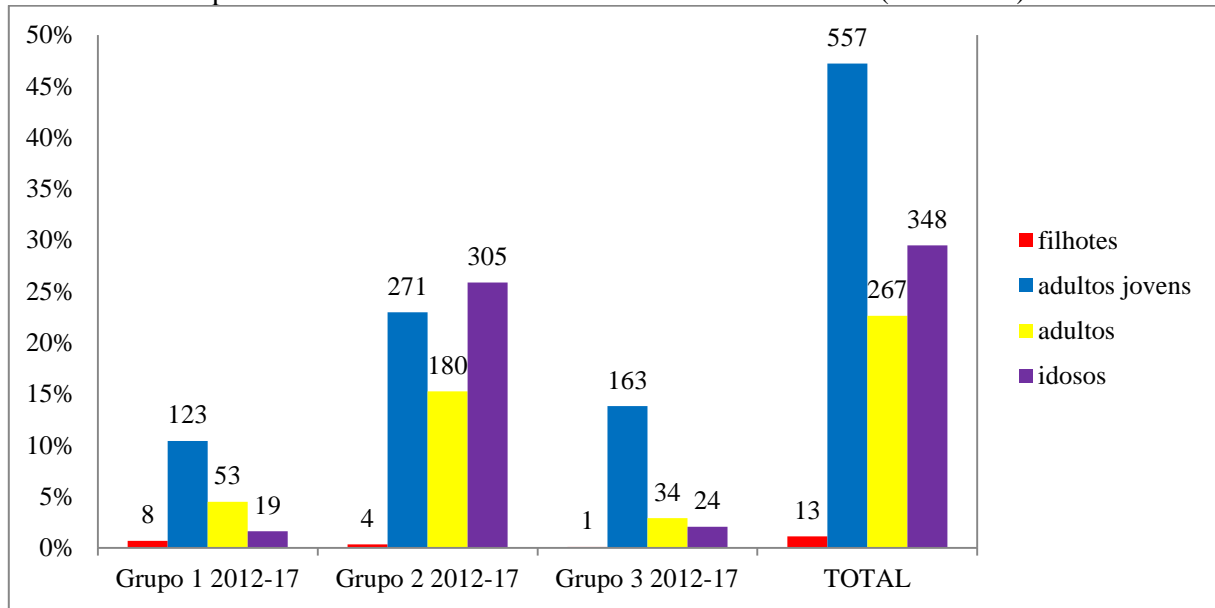
Com relação às variações de raças, entre as 1.185 cadelas a distribuição foi de 60,1% mestiças ($n=712$); 9,96% Poodle ($n=118$); 7,59% Pinscher ($n=90$); 4,98% Shih Tzu ($n=59$); 3,46% Pit Bull ($n=41$); e 13,93% ($n=165$) outras raças, representadas na figura 1.

Figura 1 – Distribuição da ocorrência de desordens reprodutivas de acordo com a raça das cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (2012-2017).



As cadelas atendidas no HV-UFU neste período, apresentaram média de idade de $6,62 \pm 3,61$ anos, e a distribuição dos animais, em relação à faixa etária (filhotes, adultos jovens, adultos e idosos), está apresentada na figura 2, onde se verificou maior ocorrência das enfermidades reprodutivas nas cadelas adultas jovens (47% - $557/1.185$), seguido das cadelas idosas com 29,4% ($348/1.185$), adultas com 22,5% ($267/1.185$) e filhotes com 1,1% ($13/1.185$).

Figura 2 - Ocorrência de desordens reprodutivas por grupos segundo a faixa etária de cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (2012-2017).



Nota: Grupo 1 – alterações de vagina e vulva; Grupo 2 – alterações de ciclo estral, ovário e útero; Grupo 3 – alterações do período gestacional e parto.

Filhotes – cadelas com menos de um ano; adultos jovens – cadelas entre um a cinco anos; adultos – cadelas entre seis e nove anos; e idosos – cadelas acima de nove anos.

A divisão das 1.185 fêmeas caninas, de acordo com a classificação por grupos de desordens reprodutivas, está apresentada na Tabela 2. As três principais doenças com maior ocorrência em caninos foram a piometra ($n= 578$), distocia ($n=161$) e TVT ($n=150$), respectivamente, de 48,8%, 13,6% e 12,6%.

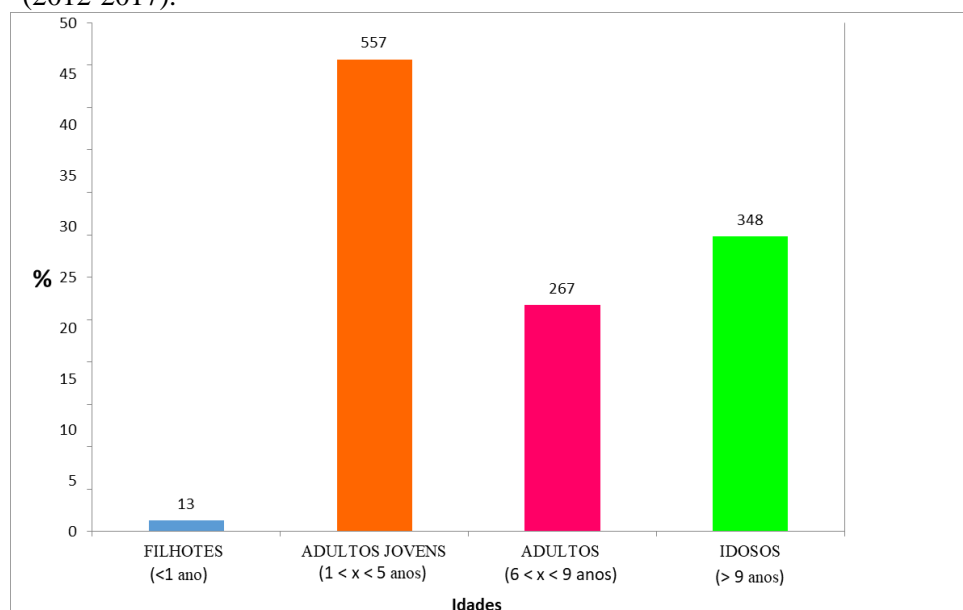
Tabela 2: Distribuição dos diagnósticos por grupos de desordens reprodutivas em cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (2012-2017)

DOENÇAS	CADELAS	
	% (n)	IDADE
GRUPO 1 (n=203)		
TVT	73,89 (150)	5,44 ± 2,45
Vaginite	18,23 (37)	2,46 ± 0,93
Prolapso Vaginal	6,40 (13)	5,87 ± 4,67
Hiperplasia Vaginal	1,48 (3)	5 ± 1,41
GRUPO 2 (n=760)		
Piometra	76,05 (578)	8,10 ± 3,44
Pseudociese	11,32 (86)	5,83 ± 3,71
HEC	4,61 (35)	7,14 ± 3,64
Hemometra	3,55 (27)	7,31 ± 3,36
Piometra de coto	0,92 (7)	5,4 ± 4,16
Prolapso uterino	0,66 (5)	2,67 ± 1,15
Ovário remanescente	1,05 (8)	4,0 ± 1,41
Endometrite	0,39 (3)	5,0 ± 0,0
Metrite pós-parto	0,39 (3)	2,5 ± 2,12
Cisto ovariano	0,66 (5)	9,0 ± 0,0
Mucometra	0,39 (3)	11,0 ± 0,0
GRUPO 3 (n=222)		
Distocia	72,52 (161)	4,56 ± 2,57
Distocia com fetos mortos	7,66 (17)	5,79 ± 2,81
Aborto	6,31 (14)	4,0 ± 3,16
Feto macerado	12,16 (27)	4,6 ± 2,59
Feto mumificado	1,35 (3)	3,0 ± 0,0

Nota: Grupo 1 – alterações de vagina e vulva; Grupo 2 – alterações de ciclo estral, ovário e útero; Grupo 3 – alterações do período gestacional e parto.

Quando comparados os três grupos de desordens reprodutivas (tabela 2), verificou-se uma maior ocorrência de doenças acometendo os adultos jovens no grupo 1 com 60,6% (123/203) e no grupo 3 com 73,4% (163/222); já no grupo 2 os animais idosos apresentaram maior prevalência, com valores de 40,1% (305/760).

Figura 3 – Ocorrência de desordens reprodutivas segundo a faixa etária de cadelas atendidas no hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (2012-2017).



DISCUSSÃO

A ocorrência de desordens reprodutivas (7,2%) observadas neste estudo corrobora com Júnior et al. (2011), que encontraram 7,65% de ocorrência de afecções reprodutivas de animais atendidos no Ambulatório Veterinário da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul - Brasil e com Montenegro (2010), de 4,3% no Hospital Veterinário de Montenegro, Vila Real – Portugal.

Das doenças relacionadas aos distúrbios de vagina e vulva (grupo 1), o TVT canino teve a maior ocorrência (73,9%). Esta patologia é uma neoplasia transplantável de células redondas cuja disseminação na população ocorre principalmente por contato sexual. Há elevada incidência em fêmeas e machos errantes e sem raça definida, com idade entre dois e cinco anos, onde há maior atividade sexual (TINUCCI-COSTA, 2009), já Amaral et al. (2004) mostraram em seu trabalho que a idade de maior frequência para o aparecimento do TVT foi de 4 anos. Estes fatores foram confirmados nesta pesquisa onde 80,6% (121/150) eram cadelas mestiças com idade média de $5,4 \pm 2,4$ anos.

Nos animais mais jovens (< 1 ano) houve maior ocorrência de vaginite (1,97% - 4/203) o que segundo Johnson (2006) pode estar relacionado à imaturidade do trato reprodutivo, sendo esta uma das etiologias para esta afecção.

Nas alterações de útero, ovários e ciclo estral (Grupo 2), destacou-se a piometra, com 76,0% do total de cadelas deste grupo, que apresentaram média de $8,1 \pm 3,4$ anos. Trautwein et al. (2017) ao estudarem piometra em cadelas, também encontraram a média de idade de $8,4 \pm 3,5$ anos, o que foi corroborado pelos nossos dados, assim como Montenegro (2010), que em estudo semelhante, encontrou maior presença desta patologia em 52% das cadelas, sendo a média de idade das cadelas de $8,6 \pm 3,4$ anos. Fukuda (2001) em seu estudo encontrou uma incidência de 15,2% (25/165) de piometra em fêmeas de mais de 4 anos de idade; já Hagman (2018) encontrou a piometra afetando mais cadelas de meia idade a idosas, não castradas, normalmente 4 meses após o estro.

Ressalta-se que a piometra segundo Jitpean et al. (2012) pode acometer até 19% das cadelas não castradas, com menos de 10 anos. Já Egenvall (2001) afirma ocorrer comumente em 25% das cadelas não castradas tratando-se da uteropatía mais comum nestes animais.

O Complexo Hiperplasia Endometrial Cística – hemometra, mucometra e piometra foi o mais frequente para fêmeas caninas nesta pesquisa, compreendendo 84,6% (643/760) com média de idade de $7,97 \pm 3,47$ anos. Esta afecção ocorre com maior frequência em fêmeas com idade média de 8 anos ou em fêmeas que passaram por tratamentos com progestágenos (HAGMAN et al., 2006). Esses dados justificam os achados em nossa pesquisa, onde os animais acima de 9 anos do grupo 2 tiveram maior ocorrência de doenças (40,1%), sendo a mais frequente a HEC, que acomete principalmente animais idosos, segundo Johnston et al. (2001).

Nas alterações de período gestacional e parto, a enfermidade que se destacou foi a distocia, definida como a dificuldade em expulsar os fetos por meio do canal do parto durante a parição, apresentando ocorrência geral de 5 a 6% das gestações em cadelas (SILVA, 2008). No presente estudo 80,2% (178/222) das cadelas apresentaram esta desordem, já Montenegro (2010) encontrou 35% (41/117) de casos de distocia em atendimentos de urgência reprodutiva em seu estudo retrospectivo.

As raças puras são mais predispostas à distocia do que as mestiças (SILVA, 2008), no entanto, os animais atendidos na rotina do HV-UFU são em sua maioria sem raça definida e neste estudo verificou-se que 58,4% das cadelas com distocia eram mestiças, 12,9% Pinscher e as demais raças somaram 28,6%. Vários fatores maternos e fetais podem contribuir para a distocia, de acordo com Wallet-Darvelid e Linde-Forsberg (2018), 75% dos casos em cadelas são de origem materna e 25% de origem fetal, sendo a inércia uterina e a má apresentação fetal as principais causas dessa enfermidade.

Foi verificado no presente estudo que, das cadelas que apresentaram patologias reprodutivas, 73,3% teriam como indicação a ovarioparingectomia (OSH), sendo 74% complexo HEC (643/869), 20,5% distocia (178/869), 3,1% maceração fetal (27/869), 1,5% prolapso vaginal (13/869), 0,58% prolapso uterino (5/869) e 0,34% feto mumificado (3/869).

Embora as causas de aborto, distocia, má formação e infertilidade não foram identificadas neste estudo, Shin e Carmichael (1999) determinaram como principal causa de aborto e infertilidade em cadelas a infecção por *Brucella canis* (brucelose canina). Santos et al. (2014) mostraram que 10% da população estudada apresentava infecção ativa pelo herpesvírus tipo 1 e alguma desordem reprodutiva, provando a circulação do vírus na população canina em Uberlândia – MG e a possível relação com essas desordens. Em estudos sobre infecções pelo herpesvírus tipo 1 são relatadas perdas relacionadas a problemas reprodutivos (RONSEE et al., 2005; DAHLBOM et al., 2009).

Estudos recentes realizados no município de Uberlândia verificaram que a ocorrência de leptospirose em cães foi de 46% (SOUZA et al., 2008), sendo que essa patologia está relacionada a desordens reprodutivas em cães, além de ser uma zoonose, (CASTRO et al., 2011).

A transmissão destas doenças infecto-contagiosas está relacionada ao manejo, densidade populacional e vacinação dos animais (CASTRO et al., 2011). Ressalta-se a importância da realização de exames sorológicos, bem como moleculares, para melhorar o diagnóstico e assim evitar a transmissão destas patologias.

O diagnóstico de doenças infecciosas que causam danos ao sistema reprodutivo como brucelose, herpesvírose, leptospirose, (SHIN; CARMICHAEL, 1999; DAHLBOM et al., 2009; CASTRO et al., 2011;) não foram pesquisadas neste estudo, no entanto, tais doenças devem ser melhor investigadas na população avaliada.

CONCLUSÃO

A ocorrência de desordens reprodutivas dos animais atendidos no HV-UFU no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2017 foi de 7,2%. As doenças que mais se destacaram em fêmeas caninas foram a piometra, TVT e distocias, e a faixa etária com maior ocorrência de doenças reprodutivas foi de animais jovens com idade entre 1 e 5 anos, sendo que as fêmeas SRD apresentaram maior frequência (60,1%) de doenças do trato reprodutivo.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. S. et al. Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo : 1994-2003). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n. 551, p. 167–171, 2004.
- BIDDLE, D.; MACINTIRE, D. K. Obstetrical emergencies. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 15, n. 2, p. 88–93, maio 2000. <https://doi.org/10.1053/svms.2000.6803>.
- BRITO FILHO, F. B. **Estudo retrospectivo das enfermidades relacionadas à clínica da reprodução de pequenos animais no período de 2001-2007 no hv-Cstr-Ufmg**. Monografia (Graduação em medicina veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande. Patos, p. 28, 2008.
- CASTRO, J. R. DE et al. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 217–222, 2011.
- DAHLBOM, M. et al. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish breeding kennels with and without reproductive problems. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, n. 1, p. 128–131, fev. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01008.x>.
- EGENVALL, A. et al. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 6, p. 530–538, 2001. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2001.tb01587.x>.
- FORDHOV. **Fórum dos Dirigentes de Hospitais Veterinários de Instituições Federais de Ensino Superior**. Disponível em: < <https://wp.ufpel.edu.br/fordhovufpel/> >. Acesso em: 15 jun. 2018.
- FRANSSON, B.; RAGLE, C. Canine pyometra: An update on pathogenesis and treatment. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 25, n. 8, p. 602–608, 2003.
- FUKUDA, S. Incidence of pyometra in colony-raised beagle dogs. **Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 4, p. 325–9, 2001.
- HAGMAN, R. et al. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2alpha metabolite analysis. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 198–206, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.11.002>.
- HAGMAN, R. Pyometra in small animals. **Veterinary clinics of north america: Small animal practice**, v. 48, n. 4, p. 639–661, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.03.001>.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Diretoria de pesquisas, coordenação de trabalho e rendimento: Pesquisa nacional de saúde (2013)**. Disponível em: < <ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf> >. Acesso em: 02 de junho de 2015.
- JITPEAN, S. et al. Breed variations in the incidence of pyometra and mammary tumours in swedish dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, S6, p. 347–350, 2012. <https://doi.org/10.1111/rda.12103>.
- JOHNSON, C. A. Distúrbios do sistema reprodutivo. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Roca, 2006. p. 811–911.
- JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V.; OLSON, P. N. Disorders of canine uterus and uterine tubes (oviducts). In: KERSEY, R. **Canine and Feline Theriogenology**. 1. ed. Philadelphia: Saunders Company, 2001. p. 206–224.
- JUNIOR, A. S. R. et al. Casuística do atendimento a pequenos animais no ambulatório veterinário – UFPEL. In: **38º CONBRAVET 2011** www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumo/990.pdf. Acesso em: 26 maio 2015.

- 394 MONTENEGRO, L. M. F. **Estudo retrospectivo de urgências reprodutivas no Hospital Veterinário**
 395 **Montenegro**. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária)- Universidade de Trás-os-Montes e Alto
 396 Douro. Vila Real, p. 63. 2010.
- 397 NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2 ed. Rio de
 398 Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 137 p.
- 399 NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Distúrbios do Sistema Reprodutor. In: **Medicina Interna de Pequenos**
 400 **Animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 897–962.
- 401
 402 PREVIATO, P. et al. Alterações morfológicas nos órgãos genitais de cães e gatos provenientes de vilas
 403 rurais da região de Umuarama-PR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, v. 8, n. 2, p.
 404 105–110, 2005.
- 405
 406 RONSSE, V. et al. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding
 407 colonies. **Theriogenology**, v. 64, n. 1, p. 61–74, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.11.016>.
 408
- 409 SANTOS, T. R.. **Molecular detection of canine herpesvirus-1 (cahv-1) in bitches with history of**
 410 **reproductive disorders from southeast Brazil**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) -
 411 Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p. 44, 2014.
- 412
 413 SHIN, S.; CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. 1999. In: **CARMICHAEL**
 414 **LE. (Ed.). Recent advances in canine infectious disease**. New York: Internacional Veterinary Information
 415 Service, Disponível em: <
 416 http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/shin/%20chapter_frm.asp%20?LA=1%3E>. Acesso
 417 em: 24 mar. 2018.
- 418
 419 SILVA, S. B. Emergências do trato reprodutivo feminino. In: SANTOS, M. M.; FRAGATA, F. S.
 420 **Emergência e terapia intensiva veterinária em pequenos animais: Bases para o atendimento hospitalar**.
 421 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Roca, 2008. p. 330–341.
- 422
 423 SMITH, F. O. Canine pyometra. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 610–612, ago. 2006.
- 424
 425 SOUZA, M. A. DE et al. **Prevalência de leptospirose em cães no município de Uberlândia, Minas**
 426 **Gerais, Brasil**. In: 4ª Semana do Servidor e 5ª Semana Acadêmica da Universidade Federal de Uberlândia.
 427 Anais... Uberlândia, 2008. Disponível em:
 428 <<https://ssl4799.websiteseguro.com/swge5/seg/cd2008/PDF/SA08-10890.PDF>>. Acesso em:25/07/2017.
 429
- 430 STALLIVIERE, F. M. *et al.* Helmintos intestinais em cães domiciliados e aspectos socioeconômicos e
 431 culturais das famílias proprietárias dos animais de Lages, SC, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v.
 432 18, n. 3, p. 22–27, 2013.
- 433
 434 TRAUTWEIN, L. G. C. *et al.* Piometras em cadelas: Relação entre o prognóstico clínico e o diagnóstico
 435 laboratorial. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, p. 1–10, 2017. [https://doi.org/10.1590/1089-6891v18e-](https://doi.org/10.1590/1089-6891v18e-44302)
 436 [44302](https://doi.org/10.1590/1089-6891v18e-44302).
- 437
 438 TINUCCI-COSTA, M. T. Tumor venéreo transmissível canino. In: DELECK, C. R.; NARDI, A. B. DE;
 439 RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: Editora Roca, 2009. p. 540–551.
- 440
 441 WALETT-DARVELID, A.; LINDE-FORSBERG, C. Dystocia in the bitch: A retrospective study of 182
 442 cases. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n. 8, p. 402–407, 2018. [https://doi.org/10.1111/j.1748-](https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1994.tb03863.x)
 443 [5827.1994.tb03863.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1994.tb03863.x).
- 444
 445 WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory**
 446 **Methods**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2011. 432 p.
- 447

CAPÍTULO 3

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO UTERINA SOBRE A PRODUÇÃO DAS
INTERLEUCINAS 6 E 12 EM CULTURAS DE ENDOMÉTRIOS CANINOS *EX VIVO*
TRATADAS COM LIPOPOLISSACARÍDEO**

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO UTERINA SOBRE A PRODUÇÃO DAS
INTERLEUCINAS 6 E 12 EM CULTURAS DE ENDOMÉTRIOS CANINOS *EX VIVO*
TRATADAS COM LIPOPOLISSACARÍDEO**

RESUMO. Em cadelas, as afecções uterinas como endometrite, hiperplasia endometrial cística e piometra têm grande relevância clínica, acometendo mais de 20% de cadelas de meia idade não castradas, sendo que são as patologias mais comuns em mais de 50% das fêmeas caninas com distúrbios reprodutivos. A hipótese do estudo foi de que a presença de inflamação no endométrio de cadelas clinicamente saudáveis compromete a resposta imune inata uterina frente à infecção bacteriana, contribuindo para o estabelecimento da piometra. Para tanto, avaliou-se a produção das interleucinas 6 (IL6) e 12 (IL12) em culturas de amostras de endométrios caninos inflamados e não inflamados desafiadas com LPS. Para o estudo, foram coletados úteros de 42 fêmeas caninas clinicamente saudáveis submetidas a ovariosalpingohisterectomia eletiva, de onde retirou-se explantes que foram transferidos para placas de cultivo celular, sendo em seguida submetidos a tratamento com controle, LPS, dexametasona e LPS + dexta. Por fim, foram recolhidos os sobrenadantes e mensurados as concentrações de IL6 e IL12 pelo método de ELISA. Os explantes foram avaliados hiatopatologicamente e classificados quanto ao tipo de inflamação em, sem inflamação, inflamação aguda, inflamação sub-aguda e inflamação crônica. Os resultados revelaram que o desafio com LPS não desencadeou síntese significativa de IL12 e principalmente de IL6 nas culturas de amostras de endométrios inflamados, indicando que cadelas com infiltrado inflamatório no endométrio podem apresentar comprometimento da resposta imune inata uterina.

Palavras-chave: Cadelas, citocinas, inflamação, imunidade uterina, piometra

ABSTRACT: In bitches, uterine conditions such as endometritis, cystic endometrial hyperplasia and pyometra have great clinical relevance, affecting more than 20% of uncastrated middle-aged bitches, being the most common pathologies in more than 50% of canine females with reproductive disorders . The hypothesis of the study was that the presence of inflammation in the endometrium of clinically healthy bitches compromises the innate immune response to bacterial infection, contributing to the establishment of pyometra. For this, the production of interleukins 6 (IL6) and 12 (IL12) in cultures of inflammatory and non-inflamed canine endometrial samples challenged with LPS were evaluated. For the study, uterus were collected from 42 clinically healthy canine females submitted to elective ovariosalpingohysterectomy, from which explants were removed and transferred to cell culture plates, and then treated with control, LPS, dexamethasone and LPS + dexamethasone. Finally, supernatants were collected and IL6 and IL12 concentrations were measured by the ELISA method. The explants were evaluated histopathologically and classified as to the type of inflammation in, without inflammation, acute inflammation, sub-acute inflammation and chronic inflammation. The results revealed that the challenge with LPS did not trigger significant synthesis of IL12 and mainly IL6 in cultures of inflamed endometrial samples, indicating that bitches with inflammatory infiltrate in the endometrium may present impaired innate immune response.

Keywords: Bitches, cytokines, inflammation, uterine immunity, pyometra

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se estudado a importância da relação entre os seres humanos e seus animais de estimação. Os resultados dessas pesquisas revelam que animais de companhia contribuem para melhorar a qualidade de vida das pessoas, uma vez que aumentam o sentimento de felicidade, reduzem o sentimento de solidão, e ainda exercem efeitos positivos sobre a saúde física e emocional de seus tutores (SUTHERS-McCABE, 2001), além de terem trazido vários outros benefícios, como segurança e assistência a pessoas com deficiência e idosos (STALLIVIERI et al., 2013).

Portanto, a busca pelo aprimoramento das diversas áreas da medicina veterinária, a fim de garantir maior expectativa e qualidade de vida para os animais domésticos, é indispensável, uma vez que existem cerca de 1,3 bilhão de animais domésticos no mundo, sendo que no Brasil esse número é de 132,4 milhões, onde 52,2 milhões são somente de cães (IBGE, 2003). Para tanto, é necessário investir em pesquisas que permitam compreender melhor as diferentes patologias que acometem esses animais.

As patologias reprodutivas podem apresentar consequências diversas, que variam desde a ausência de sinais clínicos e o comprometimento da fertilidade do animal, até manifestações clínicas agudas, que podem levar ao óbito (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Na medicina veterinária, enfermidades do sistema reprodutor são comuns, para ambos os sexos, nas mais variadas espécies (PREVIATO et al., 2005), sendo assim, a preservação da capacidade reprodutiva é, na maioria dos casos, de grande importância para esses animais, levando-se em conta, a genética e o valor zootécnico do animal em questão (BRITO FILHO, 2008; STALLIVIERI et al., 2013).

Em se tratando da espécie canina, sabe-se que a infecção uterina, denominada piometra, apresenta elevada casuística, sendo que um estudo realizado na Suécia revelou que essa patologia acomete aproximadamente um quarto de todas as cadelas antes de atingirem 10 anos de idade (EGENVALL et al., 2001). Sabe-se ainda que a piometra está associada à ocorrência de reações inflamatórias sistêmicas, podendo levar o animal a óbito, exigindo cuidados intensivos e imediatos (KARLSSON et al., 2012; HAGMAN, 2017). No entanto, a patogenia dessa afecção uterina ainda não está elucidada, uma vez que apresenta diferentes graus de morbidade e mortalidade sendo influenciada por condições ambientais, histórico reprodutivo e tratamentos prévios com fármacos (PREVIATO et al., 2005).

Pesquisas associam a ocorrência da piometra à presença da hiperplasia endometrial cística (HEC), sendo esta condição considerada um fator predisponente ao estabelecimento da piometra. Muitos estudos têm sido realizados a fim de elucidar a real associação entre essas afecções reprodutivas e compreender de que forma elas interferem na resposta imune inata uterina de cadelas

(HAGMAN; RÖNNBERG; PEJLER, 2009). Porém, não existem pesquisas que tenham avaliado se uma condição inflamatória presente no endométrio de cadelas, poderia interferir na resposta imune inata uterina frente a uma posterior infecção por agentes bacterianos, contribuindo para o estabelecimento da piometra e ocorrência de efeitos sistêmicos.

O presente estudo considerou relevante investigar a hipótese do efeito da inflamação comprometer a imunidade inata uterina através da produção das interleucinas 6 (IL6) e 12 (IL12) em culturas de endométrios caninos *ex vivo* desafiadas com LPS, além de avaliar a presença de infiltrado inflamatório nos úteros de cadelas clinicamente saudáveis e entender de que maneira essa inflamação interfere na produção de citocinas pró-inflamatórias no endométrio canino, além de demonstrar que o modelo experimental de culturas *ex vivo* de endométrio funciona adequadamente para a espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e coleta de amostras

Para a realização deste estudo foram coletados úteros de 42 fêmeas caninas clinicamente saudáveis submetidas a ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva, conforme técnica cirúrgica proposta por Slatter (2007). Imediatamente após o procedimento cirúrgico, os úteros foram coletados, mantidos refrigerados em caixas térmicas e encaminhados ao Laboratório de Saúde em Grandes Animais da Universidade Federal de Uberlândia para o devido processamento.

Os dados referentes ao histórico reprodutivo das cadelas foram anotados em fichas específicas, bem como os parâmetros do exame físico geral. Como critério de inclusão no experimento as cadelas não poderiam apresentar sinais clínicos compatíveis com afecções do trato reprodutivo ou de qualquer outro sistema, devendo ser todas consideradas híginas e aptas ao procedimento cirúrgico.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi realizado segundo o fluxograma apresentado na figura 1. Os úteros coletados foram separados em quatro grupos experimentais de acordo com a avaliação histopatológica do endométrio preconizada neste estudo, sendo: a) grupo sem inflamação; b) grupo inflamação aguda; c) grupo inflamação subaguda; d) grupo inflamação crônica.

No laboratório, os cultivos *ex vivo* de endométrio canino foram expostos aos seguintes tratamentos durante 24 horas: a) controle: amostras tratadas apenas com meio de cultivo; b) LPS: amostras tratadas com meio de cultivo e LPS (1µg/mL); c) DEXA: amostras tratadas com meio de cultivo e dexametasona (5ng/mL); d) LPS+DEXA: amostras tratadas com meio de cultivo, LPS (1µg/mL) e dexametasona (5ng/mL). Após o período de cultivo, os sobrenadantes foram coletados e armazenados congelados para posterior realização da técnica de ELISA para dosagem das citocinas IL6 e IL12.

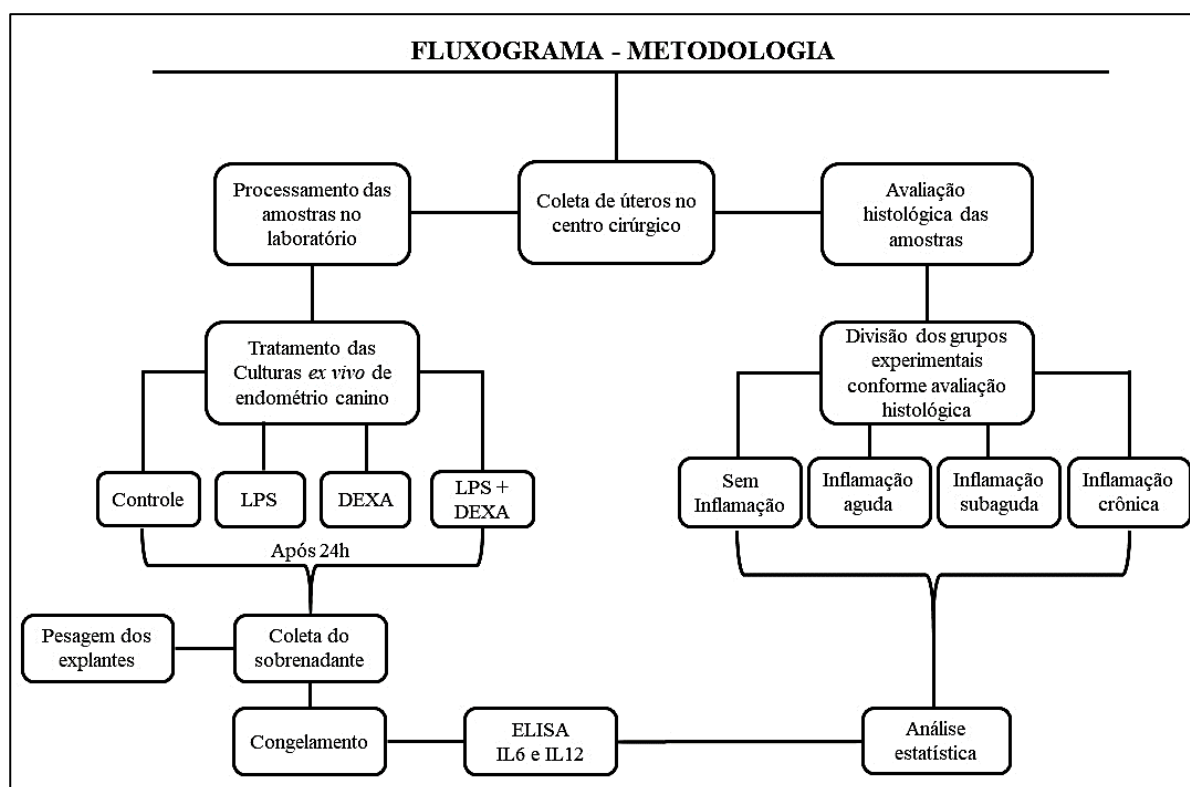


Figura 1. Apresentação esquemática das etapas do experimento e dos grupos experimentais.

Processamento das amostras

Após serem transportados ao laboratório, os úteros foram lavados externamente com álcool 70%. Em seguida, foi feita uma incisão transversal em cada corno uterino, imediatamente acima do ligamento intercornual, seguida de incisão no sentido longitudinal, ao longo de todo o corno, conforme a técnica preconizada por Borges et al. (2012). Posteriormente, o endométrio exposto foi lavado com solução Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) suplementada com 50 UI/mL de penicilina, 50 µg/mL estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 2,5 µg/mL anfotericina B (Sigma-Aldrich®).

Realizou-se, então, a delimitação de fragmentos de tecido uterino (endométrio e miométrio), denominados explantes, utilizando-se *punch* estéril de 6mm para biópsia (Kruuse, Langeskov, Denmark), os quais foram destacados com tesoura e acondicionados em recipientes contendo 30mL de solução Hank's Balanced Salt (HBSS; Sigma-Aldrich®) suplementada com 50 UI/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina e 2,5 µg/mL anfotericina B. Ademais, foi coletado um explante para exame histopatológico, o qual foi acondicionado em microtubo contendo 1000µL de formol 10%.

Os explantes foram levados à cabine de segurança, onde realizou-se duas lavagens na solução HBSS suplementada com 50 UI/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina e 2,5 µg/mL anfotericina B por 5 minutos, evitando movimentos abruptos para que os explantes não fossem mecanicamente estimulados. As amostras foram, então, transferidas individualmente para placas de cultura celular com 24 poços (Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brasil) com 2 mL de meio completo de cultura composto por Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI Medium 1640; Gibco® ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), Soro Fetal Bovino (FBS; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 50 UI/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina e 2,5 µg/mL anfotericina B.

Para cada animal, quatro explantes foram coletados e submetidos a tratamentos distintos. O primeiro explante foi tratado apenas com meio de cultivo completo composto por 500 mL de RPMI 1640, 50mL de FBS, 5mL de Penicilina/Estreptomicina, 5mL de Anfotericina B, constituindo o controle. O segundo explante foi tratado com solução de LPS 1µg/mL (Ultrapure LPS, E. coli 0111:B4; InvivoGen, San Diego, CA, USA) em meio de cultivo completo. O terceiro explante foi tratado com solução de dexametasona 5ng/mL (D4902-25MG Dexamethasone; Sigma-Aldrich®) em meio de cultivo completo. O quarto explante foi tratado com solução de LPS 1µg/mL (InvivoGen) e solução de dexametasona 5ng/mL (Sigma-Aldrich®) em meio de cultivo completo.

Cada explante foi mantido em seu respectivo poço da placa de cultivo por 24 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de vapor. Após 24 horas os explantes foram pesados em balança de precisão (AX200 Marte® Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e o sobrenadante de cada poço foi congelado a -20°C para posterior dosagem das concentrações de IL6 e IL12 por meio de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Realização do ELISA

As concentrações de IL6 e IL12 presentes no sobrenadante de cada amostra foram mensuradas pela técnica ELISA de captura, de acordo com as instruções do fabricante (DuoSet ELISA Development Systems; R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA). Para dosagem de IL6 utilizou-se o kit DuoSet ELISA Development Systems Canine IL-6 (R&D Systems®), já para dosagem de IL12 utilizou-se o kit DuoSet ELISA Development Systems Canine IL-12/IL-23 p40 (R&D Systems®).

Primeiramente as placas de ELISA eram sensibilizadas com anticorpo de captura diluído em solução *Phosphate Buffered Saline* (PBS) e permaneciam em temperatura ambiente *overnight*. No dia seguinte, as placas eram lavadas três vezes com *wash buffer*, em seguida era feito o bloqueio

adicionando-se reagente diluente em cada poço, mantendo-se as placas em temperatura ambiente por uma hora. Após esse intervalo, as placas eram novamente lavadas três vezes com *wash buffer*, as amostras ou soluções padrão eram adicionadas aos seus respectivos poços e as placas permaneciam em temperatura ambiente por duas horas. As concentrações mínima e máxima utilizadas como padrão foram, respectivamente, 62,5pg/mL e 4000pg/mL, para ambas as interleucinas.

Posteriormente, as placas eram lavadas três vezes com *wash buffer* e adicionava-se anticorpo de detecção diluído no reagente diluente em cada poço, as placas eram mantidas em temperatura ambiente durante mais duas horas. Decorrido esse tempo, as placas eram lavadas três vezes com *wash buffer*, adicionava-se solução diluída de *Streptavidin-HRP* em cada poço e deixava-se as placas em temperatura ambiente por 20 minutos, protegidas da incidência direta da luz. Logo depois, as placas eram lavadas três vezes com *wash buffer*, adicionava-se solução substrato em cada poço e mantinha-se as placas em temperatura ambiente por 20 minutos, novamente protegidas da incidência direta da luz. Em seguida, adicionava-se *stop solution* (ácido clorídrico) em cada poço e agitava-se cuidadosamente as placas.

Rapidamente transportava-se as placas, ao abrigo da luz, até o aparelho SpectraMax® M2/M2° (Molecular Devices Corporation, San Jose, CA, USA) para leitura da densidade óptica utilizando-se os filtros de 450nm e 570nm no programa SoftMax Pro Software (Molecular Devices Corporation). Os valores obtidos eram transcritos para o programa Microsoft® Office Excel e realizava-se a correção subtraindo o valor encontrado no filtro de 450nm pelo valor encontrado no filtro de 570nm. Os resultados obtidos eram, então, analisados pelo programa MyAssays Analysis Software Solutions® (<https://www.myassays.com/>).

Para cada amostra foram obtidas duas concentrações em pg/mL, sendo posteriormente calculada a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação e o erro padrão da média desses valores. Por fim, calculava-se a concentração de interleucina pelo peso do explante, obtendo-se os valores em pg/mg, os quais foram utilizados na análise estatística.

Avaliação histopatológica

Os fragmentos de endométrio destinados ao exame histopatológico foram fixados por imersão em solução 10% de formol, incluídos em parafina, seccionados a 5-8 µm de espessura e, posteriormente, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), conforme técnica de avaliação histopatológica de rotina.

Para a interpretação dos achados histopatológicos do tecido uterino foi considerado a presença ou ausência de infiltrado inflamatório, bem como o grau de inflamação e o tipo de célula inflamatória predominante no infiltrado; edema; hemorragia; e proliferação de fibroblastos. Essas alterações foram classificadas baseando-se no grau de severidade, variando de 0 a 3, sendo 0: alteração inexistente; 1: alteração discreta; 2: alteração moderada; e 3: alteração acentuada.

Desse modo, a classificação histopatológica dos endométrios foi realizada com base na soma de três fatores: achados histopatológicos observados, graduação das alterações, e caracterização do exsudato. As amostras foram, então, classificadas em oito categorias: normal, hemorrágica, fibrótica, fibrohemorrágica, subaguda, neutrofílica, linfocítica e crônica, as quais foram consideradas para a posterior divisão em grupos experimentais.

Definiu-se como normal as amostras que apresentaram apenas edema ou nenhuma alteração; hemorrágica: amostras que apresentaram apenas hemorragia ou edema e hemorragia; fibrótica: amostras que apresentaram apenas proliferação de fibroblastos ou edema e proliferação de fibroblastos; fibrohemorrágica: amostras que apresentaram hemorragia e proliferação de fibroblastos ou edema, hemorragia e proliferação de fibroblastos; subaguda: amostras que apresentaram infiltrado inflamatório misto composto predominantemente por neutrófilos degenerados e macrófagos reativos ou misto composto por neutrófilos hipersegmentados, macrófagos e raros eosinófilos; neutrofílica: amostras que apresentaram infiltrado inflamatório neutrofílico; linfocítica: amostras que apresentaram infiltrado inflamatório linfocitário; crônica: amostras que apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear com predomínio de linfócitos e macrófagos reativos ou mononuclear com predomínio de macrófagos reativos ou ainda mononuclear com predomínio de linfócitos.

Para o delineamento experimental as amostras foram divididas em quatro grupos. a) grupo sem inflamação: amostras que histologicamente não apresentaram infiltrado inflamatório, sendo que algumas apresentaram, de forma associada ou independente, edema, hemorragia e fibroblastos; b) grupo inflamação aguda: amostras que histologicamente apresentaram infiltrado inflamatório neutrofílico; c) grupo inflamação subaguda: amostras que histologicamente apresentaram infiltrado inflamatório misto; d) grupo inflamação crônica: amostras que histologicamente apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear.

Análise estatística

Para a análise os dados foram inicialmente tabulados em planilhas do programa Microsoft® Office Excel. A estatística descritiva foi apresentada em média, erro padrão da média e porcentagem em relação ao controle. Para a análise e confecção das figuras foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

As concentrações de IL6 e IL12 obtidas através da técnica de ELISA foram submetidas ao Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados 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. Todas as análises foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Resultados referentes ao histórico das cadelas

Os 42 animais incluídos neste experimento eram fêmeas caninas, clinicamente saudáveis, com idade entre sete meses e oito anos e peso médio de 11,59Kg. Em relação à raça, 90,5% (38/42) das cadelas não apresentavam raça definida e 9,5% (4/42) foram identificadas por seus tutores como pertencentes a uma raça, sendo 4,8% (2/42) da raça Pinscher, 2,4% (1/42) da raça Labrador e 2,4% (1/42) da raça Rottweiler. De acordo com a classificação proposta por Goldston e Hoskins (1999), 11,9% (5/42) das cadelas eram filhotes (até um ano de idade) e 88,1% (37/42) eram adultas (um a nove anos de idade).

Os dados do histórico reprodutivo das cadelas revelaram que 73,8% (31/42) já haviam apresentado cio antes de serem submetidas ao procedimento cirúrgico OSH, 11,9% (5/42) não apresentaram cio antes da OSH e 14,3% (6/42) não tinham histórico. Em relação à ordem de parto, as porcentagens observadas foram: 52,4% (22/42) nulíparas, 14,3% (6/42) primíparas, 7,1% (3/42) múltíparas e 26,2% (11/42) sem histórico.

Resultados referentes à avaliação histopatológica das amostras

Os 42 úteros coletados para o presente estudo foram histologicamente avaliados e classificados em oito categorias, sendo elas: normal, hemorrágica, fibrótica, fibrohemorrágica, subaguda, neutrofílica, linfocítica e crônica. A fim de avaliar de forma mais específica a interferência da inflamação presente ou não nas amostras sobre os resultados, as categorias normal, hemorrágica, fibrótica e fibrohemorrágica foram enquadradas em um único grupo, denominado grupo sem inflamação ($n=23$). A categoria neutrofílica foi denominada grupo inflamação aguda ($n=8$). Já as categorias subaguda e crônica foram denominadas grupo inflamação subaguda ($n=6$) e grupo inflamação crônica ($n=4$), respectivamente. A categoria linfocítica não foi incluída em nenhum grupo devido ao fato de apresentar característica histológica distinta das demais e ser constituída por apenas uma amostra ($n=1$).

Dentre as amostras avaliadas, 45,2% (19/42) apresentaram inflamação, sendo 21,1% (4/19) inflamação crônica, 31,6% (6/19) inflamação subaguda, 42,1% (8/19) inflamação aguda, e 5,3% (1/19) inflamação linfocítica.

Resultados referentes ao ELISA

Mediante realização de ELISA obteve-se as concentrações, em picogramas por miligrama de tecido (pg/mg), das citocinas IL6 e IL12 no sobrenadante de culturas de endométrios caninos *ex vivo* tratadas com meio controle e meios contendo 1µg/mL LPS, 5ng/mL dexametasona ou 1µg/mL LPS + 5ng/mL dexametasona.

As médias das concentrações (pg/mg) das citocinas IL6 e IL12 no sobrenadante de culturas de endométrios caninos *ex vivo* desafiadas com 1µg/mL LPS e 5ng/mL dexametasona durante 24 horas estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Resposta das interleucinas 6 e 12 (pg/mg) de culturas de endométrio canino *ex vivo* com diferentes graus de inflamação frente à exposição ao lipopolissacarídeo e à dexametasona durante 24 horas.

		TRATAMENTOS			
		Controle	LPS	DEX	LPS+DEX
SEM-INFLAMAÇÃO (n = 23)	IL6	68,9 + 14,3	188,9 + 41,2	59,5 + 22,2	116,8 + 23,7
	IL12	1,21 + 0,15	3,45 + 0,41	1,01 + 0,16	4,19 + 0,96
INFL. AGUDA (n = 8)	IL6	159,2 + 106,4	243,0 + 98,1	29,0 + 9,8	165,1 + 96,7
	IL12	1,47 + 0,39	6,88 + 2,10	0,92 + 0,31	4,26 + 2,05
INFL. SUBAGUDA (n = 6)	IL6	130,2 + 53,5	260,3 + 60,7	60,9 + 36,1	222,2 + 58,6
	IL12	2,42 + 0,90	7,99 + 4,62	4,02 + 3,19	5,45 + 2,77
INFL. CRÔNICA (n = 4)	IL6	70,8 + 35,4	126,2 + 38,4	34,2 + 23,4	98,8 + 60,9
	IL12	1,20 + 0,44	3,66 + 1,38	1,04 + 0,57	3,84 + 1,20

Nota. Endométrios caninos foram agrupados conforme a ausência (sem-inflamação) ou presença de inflamação aguda, subaguda e crônica. Os endométrios foram desafiados por 24 h com meio controle (Controle) e meios contendo 1µg/mL LPS (LPS), 5ng/mL de dexametasona (DEX) ou ambos (LPS+DEXA). Os dados estão apresentados em média + erro padrão da média da concentração (pg) da IL6 ou IL12 por mg de tecido.

Quando expostos a 1µg/mL de LPS os explantes de endométrios sem-inflamação responderam significativamente com acúmulo de IL6 (Fig. 2A), no entanto, nos grupos em que havia a presença de inflamação (Fig. 2B-D) não houve acúmulo significativo. Apesar de haver redução da resposta com o uso da dexametasona, frente ao desafio com LPS, esta não foi significativa ($P>0,05$) nos cultivos *ex vivo* dos endométrios em nenhuma condição.

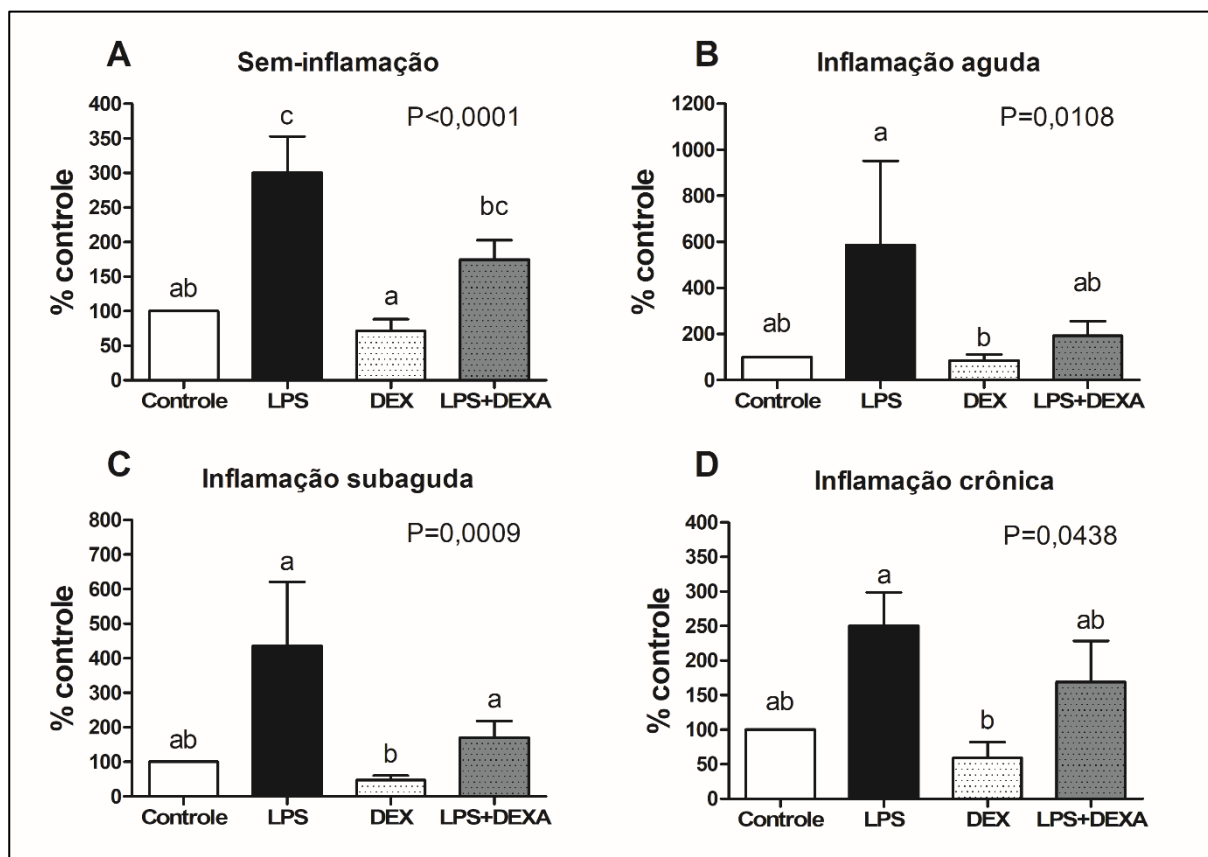


Figura 2. Resposta da interleucina 6 de culturas de endométrio canino *ex vivo* com diferentes graus de inflamação frente à exposição ao lipopolissacarídeo e à dexametasona durante 24 horas.

Endométrios caninos foram agrupados conforme a ausência (A) ou presença de inflamação aguda (B), subaguda (C) e crônica (D). Os endométrios foram desafiados por 24h com meio controle (Controle) e meios contendo 1µg/mL LPS (LPS), 5ng/mL de dexametasona (DEX) ou ambos (LPS+DEXA). Os dados estão apresentados em média + erro padrão da média da porcentagem da concentração de IL6 em relação ao controle e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn's ($P<0,05$).

Os explantes de endométrios sem-inflamação (Fig. 3A), inflamação aguda (Fig. 3B) e inflamação crônica (Fig. 3D) quando expostos a 1µg/mL de LPS responderam significativamente com acúmulo de IL12 ($P<0,05$), no entanto, no grupo com endométrios apresentando inflamação subaguda (Fig. 3C) não houve acúmulo significativo. Apesar de haver redução da resposta com o

uso da dexametasona, frente ao desafio com LPS, esta não foi significativa ($P>0,05$) nos cultivos *ex vivo* dos endométrios em nenhuma condição, semelhantemente ao ocorrido com a IL6 (Fig. 2).

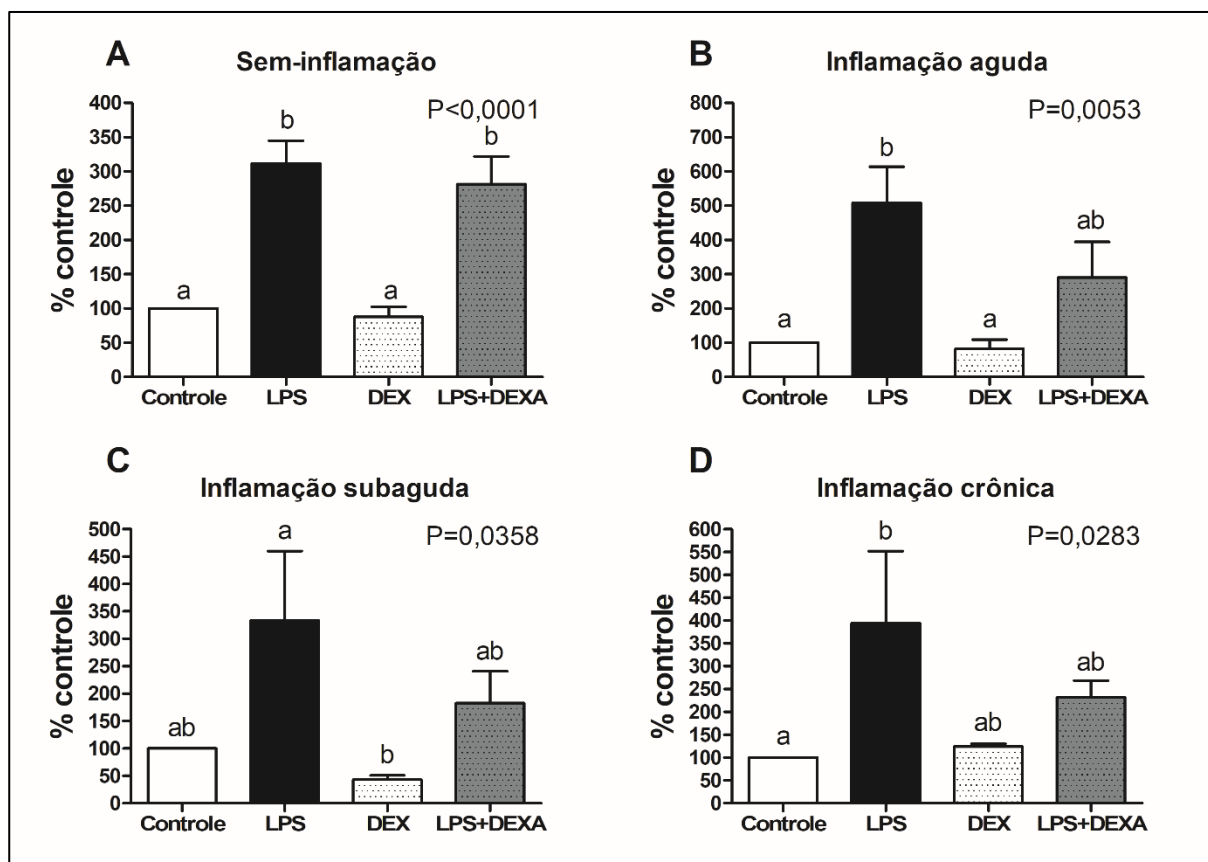


Figura 3. Resposta da interleucina 12 de culturas de endométrio canino *ex vivo* com diferentes graus de inflamação frente à exposição ao lipopolissacarídeo e à dexametasona durante 24 horas.

Endométrios caninos foram agrupados conforme a ausência (A) ou presença de inflamação aguda (B), subaguda (C) e crônica (D). Os endométrios foram desafiados por 24h com meio controle (Controle) e meios contendo 1µg/mL LPS (LPS), 5ng/mL de dexametasona (DEX) ou ambos (LPS+DEXA). Os dados estão apresentados em média + erro padrão da média da porcentagem da concentração de IL12 em relação ao controle e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn's ($P<0,05$).

DISCUSSÃO

Os achados histológicos deste estudo foram semelhantes aos encontrados por Dow (1959) e De Bosschere et al. (2001), no que se refere à divisão dos grupos experimentais conforme a presença ou ausência de inflamação e o tipo de infiltrado inflamatório nas amostras. No entanto, divergiram desses estudos em relação aos aspectos clínicos dos animais incluídos no experimento e à possibilidade de correlacionar a inflamação com outras afecções, como a HEC. Em seu estudo, Dow (1959) dividiu 100 amostras de úteros em quatro grupos distintos, conforme as características histológicas de cada uma. Contudo, os animais incluídos naquele experimento apresentavam, em sua maioria, alterações clínicas ou hematológicas, já os animais incluídos no presente estudo foram submetidos a OSH eletiva e estavam clinicamente saudáveis, de acordo com o exame clínico proposto.

De Bosschere et al. (2001) avaliaram histologicamente amostras uterinas de cadelas clinicamente saudáveis, sendo que, dentre essas amostras, muitas apresentavam características de afecções uterinas como HEC nos graus leve e grave, e mucometra, porém não apresentavam infiltrado inflamatório, diferentemente do observado no presente estudo. Ademais, De Bosschere et al. (2001) também avaliaram a histologia de amostras dos úteros de cadelas com suspeita clínica de piometra, encontrando características compatíveis com HEC leve, HEC grave, mucometra, endometrite, piometra hiperplásica ou piometra atrófica, sendo as amostras correspondentes às três últimas patologias as únicas que apresentaram inflamação. Desse modo, sinais clínicos foram verificados em todos os casos em que infiltrado inflamatório foi encontrado no útero, o que não foi observado na presente pesquisa.

Na pesquisa feita por Gifford, Scarlet e Schlafer (2014), observaram na avaliação histológica de biópsias uterinas de cadelas com diferentes históricos, a presença de endometrite em 42,6% (170/399) dos casos, sendo esta a lesão uterina mais prevalente entre as amostras avaliadas, seguida da HEC (33% - 133/399), porém, não houve associação significativa entre a ocorrência de endometrite e HEC (GIFFORD; SCARLETT; SCHLAFER, 2014). No presente estudo, detectou-se presença de inflamação em 45,2% (19/42) das amostras avaliadas, uma porcentagem semelhante à encontrada por Gifford, Scarlet e Schlafer (2014), contudo, a metodologia aplicada para coleta e processamento das amostras nos dois estudos foi diferente. Além disso, neste estudo, encontrou-se maior porcentagem de inflamação aguda, enquanto Gifford, Scarlet e Schlafer (2014) encontraram maior porcentagem de inflamação crônica, o que pode estar relacionado ao fato da idade da maioria dos animais ser superior a 6 anos, diferentemente deste estudo em que 73,8% (31/42) dos animais apresentaram idade igual ou inferior a 3 anos.

Esses dados permitem inferir que a presença de infiltrado inflamatório no endométrio de cadelas é um achado frequente, quando se avalia a histologia de fragmentos de tecido uterino. Sendo assim, é imprescindível buscar entender de que maneira essa condição inflamatória interfere na resposta imune inata uterina de cadelas que apresentem ou não sinais clínicos compatíveis com afecções reprodutivas. Para tanto, esta pesquisa utilizou-se de culturas de tecidos *ex vivo*, que vêm sendo empregadas no meio científico em estudos que visam avaliar a resposta imune diante de diferentes estímulos promovidos pelo cultivo *in vitro* de fragmentos teciduais (SILVA et al., 2010; FRANZAK et al., 2013; JURSA et al., 2014). Em cadelas, esse modelo de culturas de endométrios *ex vivo* também tem sido utilizado para avaliação de diferentes aspectos referentes ao trato reprodutivo canino (STADLER et al., 2009; SILVA et al., 2010; PRAPAIWAN et al., 2017).

Sabe-se que o LPS presente na parede celular de bactérias Gram-negativas é reconhecido por receptores TLR4, expressos pelas células endometriais, e desencadeia a secreção de mediadores inflamatórios, como a citocina IL6 (SHELDON; ROBERTS, 2010; TURNER; HEALEY; SHELDON, 2012). No presente estudo avaliou-se o efeito do desafio com LPS sobre a produção de IL6 e IL12 pelas culturas de endométrios caninos *ex vivo* que já apresentavam ou não infiltrado inflamatório. Observou-se que a porcentagem de acúmulo de IL6 e IL12 foi significativamente maior ($P<0,05$) no sobrenadante das culturas de endométrios caninos *ex vivo* de cadelas sem inflamação endometrial desafiadas com 1µg/mL LPS, quando comparadas a amostras sem inflamação não desafiadas.

A mesma concentração de LPS utilizada no presente estudo também teve resposta positiva no trabalho de Silva et al. (2012) em que observaram maior produção das prostaglandinas PGF_{2α} e PGE₂ no sobrenadante das amostras desafiadas com LPS, em comparação àquelas desafiadas com ácido lipoteicóico (LTA) e àquelas não desafiadas. Ademais, essa dose de LPS também foi aplicada a cultivos de endométrios bovinos *ex vivo* e desencadeou a resposta de citocinas pró-inflamatórias, como IL1B e IL6 (SAUT et al., 2014).

Entretanto, nos grupos inflamação aguda, inflamação subaguda e inflamação crônica não houve aumento significativo ($P>0,05$) da porcentagem de acúmulo de IL6 no sobrenadantes das culturas de endométrios caninos *ex vivo* desafiadas com LPS, quando comparado ao acúmulo de IL6 no sobrenadante das culturas de endométrios caninos *ex vivo* tratadas com meio controle. Sendo assim, observa-se que a presença de inflamação no endométrio de cadelas interferiu na produção de IL6 em resposta ao desafio com LPS, o que pode sugerir um papel importante desse processo inflamatório prévio na redução da capacidade da resposta imune inata uterina em combater microrganismos que possam infectar o útero.

Na literatura consultada, a maioria das pesquisas apresentam resultados que evidenciam a ativação da resposta imune frente a processos infecciosos avançados, a exemplo dos estudos

realizados com amostras de endométrios de cadelas, os quais avaliaram a expressão de diversos genes relacionados à produção de mediadores inflamatórios, e observaram expressão de *IL6* significativamente aumentada nos úteros acometidos por piometra, em comparação com úteros saudáveis (HAGMAN; RÖNNBERG; PEJLER, 2009; BUKOWSKA et al., 2014). Contudo, nesses casos o processo infeccioso grave já estava estabelecido, não sendo possível saber qual era a condição imunológica do útero anteriormente à ocorrência da piometra.

Voorwald et al. (2015) avaliaram o perfil de expressão gênica encontrado em amostras de cadelas diagnosticadas com piometra, em comparação ao encontrado nas amostras de cadelas que apresentavam HEC, mucometra ou que não apresentavam alterações e estavam no diestro. A expressão de *IL6* foi maior principalmente nas amostras endometriais de cadelas com piometra que haviam sido previamente tratadas com progestágenos (VOORWALD et al., 2015). Os resultados encontrados por Voorwald et al. (2015) sugeriram que a HEC pode predispor o desenvolvimento de mucometra e piometra, porém, não estabeleceram relação entre a presença ou ausência de inflamação no endométrio e a resposta imune inata uterina frente a desafios infecciosos, como proposto pela presente pesquisa.

Kasimanickam e Kastelic, (2014) observaram maior expressão de *IL6* nas amostras endometriais de vacas com endometrite subclínica quando comparado a vacas normais. Entretanto, nas vacas com metrite ou endometrite clínica esta expressão de *IL6* não foi observada. Tais achados podem ser correlacionados aos encontrados no presente estudo, visto que úteros com processos infecciosos mais severos apresentaram expressões de *IL6* diferentes das observadas em úteros saudáveis ou com endometrite subclínica, assim como no endométrio de cadelas foi observado interferência da presença de processo inflamatório sobre a produção de *IL6*. Ressalta-se que a metodologia e a espécie empregada por Kasimanickam e Kastelic, (2014) foram distintas das utilizadas no presente estudo.

Todavia, diferentemente do observado na dosagem de *IL6*, a porcentagem de acúmulo de *IL12* foi significativamente maior ($P < 0,05$) no sobrenadante das culturas de endométrios caninos *ex vivo* dos grupos inflamação aguda e inflamação crônica expostas a 1µg/mL de LPS, quando comparada à porcentagem de acúmulo de *IL12* no sobrenadante das amostras dos grupos inflamação aguda e inflamação crônica tratadas com meio controle. No entanto, no sobrenadante das amostras do grupo inflamação subaguda desafiadas com 1µg/mL LPS não houve aumento significativo ($P > 0,05$) da porcentagem de acúmulo de *IL12*, em comparação com a porcentagem de acúmulo de *IL12* no sobrenadante das amostras tratadas com meio controle.

Na literatura consultada não há estudos que tenham avaliado a influência da presença de inflamação no endométrio de cadelas sobre a produção de *IL12*. Ye et al. (2009) avaliaram, por meio de ELISA, a produção de *IL12* no sobrenadante de culturas de macrófagos alveolares tratadas

com meio controle ou LPS (100ng/mL), provenientes do lavado broncoalveolar de humanos com alveolite alérgica extrínseca. Nesse estudo, observou-se aumento da produção de IL12 nas amostras referentes à alveolite alérgica extrínseca com características inflamatórias aguda e crônica, independentemente do desafio com LPS, quando comparado a amostras de pacientes sem alveolite alérgica extrínseca (YE et al., 2009), o que evidencia a influência do processo inflamatório sobre a produção de IL12, mas não em resposta ao LPS, como verificado nesta pesquisa.

No presente estudo, o tratamento dos explantes endometriais de cadelas com dexametasona não provocou redução significativa da produção de IL6 e IL12 em resposta ao LPS ($P>0,05$), tanto em endométrios caninos inflamados, quanto naqueles sem inflamação.

Esse resultado se distingue dos obtidos por Saut et al. (2014) que observaram redução do acúmulo de IL6 em resposta ao desafio com LPS nas culturas de endométrios bovinos *ex vivo* submetidas ao pré-tratamento com dexametasona ao utilizar a mesma concentração utilizada no presente estudo (5ng/mL), um dado interessante que pode refletir a diferença do efeito desse glicocorticoide na resposta imune de espécies distintas.

Em humanos, a ação supressiva da dexametasona também foi descrita por Lee et al. (2018) que avaliaram seus efeitos no envelhecimento de células-tronco mesenquimais, e constataram menor expressão gênica de *IL6* nas células-tronco tratadas com dexametasona (concentração 10^{-7} M) por 24 horas, em comparação com o grupo controle tratado com etanol (concentração 10^{-7} M) por 24 horas, demonstrando que esse glicocorticoide age reduzindo a expressão de *IL6*. Esse dado concorda com Saut et al. (2014) que também encontraram menor expressão de *IL6* nas amostras de endométrio bovino tratadas com dexametasona (5ng/mL) e desafiadas com LPS ou *E. coli*.

Estudos que evidenciem a ação da dexametasona sobre a produção de IL12 em cadelas não foram encontrados, porém, um estudo realizado por Agarwal e Marshal, (1998) avaliaram a produção de IL12 no sobrenadante de culturas de células mononucleares de sangue periférico tratadas somente com LPS (5µg/mL) ou com LPS (5µg/mL) e dexametasona nas concentrações 10^{-9} M, 10^{-8} M ou 10^{-7} M. Foi observado que independentemente das doses de dexametasona houve redução da produção de IL12, mas aumentaram a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL10 e IL4.

Outro estudo realizado por Gong et al. (2011) avaliou a influência da dexametasona (doses: 50µg/L, 100µg/L e 200µg/L) sobre a produção de IL12 no sobrenadante de culturas de células dendríticas de ratos. Foi observado que as concentrações de IL12 foram significativamente menores nos grupos tratados com dexametasona, comparado ao grupo controle. Entretanto, a presente pesquisa não encontrou evidências significativas da ação da dexametasona na concentração 5ng/mL sobre a produção de IL6 e IL12 em culturas de endométrios caninos *ex vivo* desafiadas com LPS, o

que torna necessário maiores investigações a respeito do efeito da dexametasona na produção de citocinas em cadelas e das doses adequadas para tratamento *in vitro* de culturas de células caninas.

Portanto, é possível perceber que existe uma lacuna na literatura concernente à avaliação da resposta imune inata no útero de fêmeas caninas. Pesquisadores dessa área vêm buscando elucidar o papel da HEC na patogenia da piometra (DE BOSSCHERE et al., 2001; VOORWALD et al., 2015) todavia, os resultados encontrados neste estudo sugerem a influência do processo inflamatório no endométrio de cadelas sobre a capacidade do tecido endometrial de reagir contra agentes patogênicos invasores mediante resposta imunológica adequada.

A IL6 e a IL12 são citocinas pró-inflamatórias produzidas por diferentes tipos celulares. Elas atuam estimulando a síntese de outros mediadores inflamatórios, além de promoverem ativação e maturação de células responsáveis pela defesa do organismo (DEL VECCHIO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Quando PAMPs, como o LPS, se ligam aos receptores TLR4, eles ativam as vias que levam à síntese dessas interleucinas e de outras moléculas inflamatórias que participam de forma conjunta da resposta imune contra os agentes infecciosos (BEUTLER et al., 2003; SHELDON; ROBERTS, 2010).

Entretanto, os resultados encontrados nesta pesquisa revelaram que o desafio com 1µg/mL LPS não desencadeou síntese significativa dessas citocinas, em especial da IL6, nas culturas de amostras de endométrios inflamados, o que pode indicar que cadelas com infiltrado inflamatório no endométrio apresentam comprometimento da resposta imune inata uterina, tornando-se mais suscetíveis ao estabelecimento de condições infecciosas graves, como a piometra, já que não conseguem responder adequadamente a infecções bacterianas.

Dessa forma, o presente estudo propõe novas perspectivas para futuras pesquisas, que poderão investigar não apenas a HEC como um fator predisponente à piometra, mas também avaliar a possível associação entre a presença de inflamação no endométrio e a produção ou expressão gênica de importantes mediadores inflamatórios no útero de cadelas, a fim de entender o efeito de condições prévias encontradas no ambiente uterino sobre a resposta imune inata local, além de ter demonstrado que o uso de explantes *ex-vivo* de endométrio funciona em cães, podendo reduzir assim o número de estudos *in vivo* na espécie.

Além disso, o presente estudo também revelou que a presença de infiltrado inflamatório no útero de cadelas nem sempre é acompanhada por sinais clínicos que evidenciem distúrbios reprodutivos. Desse modo, demonstrou-se a necessidade de aplicar novos métodos diagnósticos na rotina dos atendimentos clínicos de médicos veterinários, visando detectar afecções reprodutivas ainda na fase inicial, reduzindo, assim, a incidência de infecções uterinas severas em cadelas.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que há elevada incidência de processos inflamatórios no endométrio de cadelas clinicamente saudáveis; e que a inflamação exerce efeito negativo sobre a produção da citocina IL6, em culturas de endométrios *ex vivo* desafiadas com LPS, sendo que na citocina IL12 somente houve efeito negativo na inflamação sub-aguda, indicando possível comprometimento da imunidade inata uterina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S. K.; MARSHALL, G. D. Glucocorticoid-induced type 1/type 2 cytokine alterations in humans: A model for stress-related immune dysfunction. **Journal of interferon and cytokine research**, v. 18, n. 12, p. 1059–1068, 1998. <https://doi.org/10.1089/jir.1998.18.1059>.
- BEUTLER, B. et al. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 4, p. 479–485, 2003. <https://doi.org/10.1189/jlb.0203082>.
- 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**, v. 67, n. 6, p. 526-539, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01106.x>.
- BRITO FILHO, F. B. **Estudo retrospectivo das enfermidades relacionadas à clínica da reprodução de pequenos animais no período de 2001-2007 no Hv-Cstr-Ufcg**. [s.l.] Universidade Federal de Campina Grande, 2008.
- BUKOWSKA, D. et al. Microarray analysis of inflammatory response-related gene expression in the uteri of dogs with pyometra. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 28, n. 4, p. 637–648, 2014.
- DE BOSSCHERE, H. et al. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: Should the two entities be disconnected?. **Theriogenology**, v. 55, n. 7, p. 1509–1519, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00498-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00498-8).
- DEL VECCHIO, M. et al. Interleukin-12: Biological properties and clinical application. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 16, p. 4677–4685, 2007. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0776>.
- DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of Comparative Pathology**, v. 69, p. 237–252, 1959. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(59\)80023-0](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(59)80023-0).
- EGENVALL, A. et al. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **J Vet Intern Med**, v. 15, n. 6, p. 530–538, 2001. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2001.tb01587.x>.
- FRANCZAK, A. et al. The effect of interleukin 1B and interleukin 6 on estradiol-17B secretion in the endometrium of pig during early pregnancy and the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 80, n. 2, p. 90–98, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.03.020>.
- GIFFORD, A. T.; SCARLETT, J. M.; SCHLAFER, D. H. Histopathologic findings in uterine

biopsy samples from subfertile bitches: 399 cases (1990-2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 2, p. 180–186, 2014. <https://doi.org/10.2460/javma.244.2.180>.

GOLDSTON, R.T.; HOSKINS, J.D. **Geriatrics e gerontologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 1999. 551p.

GONG, Y. et al. Experimental study of the mechanism of tolerance induction in dexamethasone-treated dendritic cells. **Med Sci Monit**, v. 17, n. 5, p. 125–131, 2011. <https://doi.org/10.12659/MSM.881758>.

HAGMAN, R. Molecular aspects of uterine diseases in dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 3, p. 37–42, 2017. <https://doi.org/10.1111/rda.13039>.

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**, v. 4, n. 11, p. 1–14 e8039, 2009.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) Diretoria de pesquisas, coordenação de trabalho e rendimento: **Pesquisa Nacional de Saúde (2013)**. Disponível em: <<ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>>. Acesso em: 02 de junho de 2015.

JURSZA, E. et al. LPS-Challenged TNF α Production, prostaglandin secretion, and TNF α /TNFRs expression in the endometrium of domestic cats in estrus or diestrus, and in cats with pyometra or receiving medroxyprogesterone acetate. **Mediators of Inflammation**, v. 20, p. 1–12, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/689280>.

KARLSSON, I. et al. Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. **Reprod Dom Anim**, v. 47, S6, p. 337–341, 2012. <https://doi.org/10.1111/rda.12034>.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; KASTELIC, J. P. Mucin 1 and cytokines mRNA in endometrium of dairy cows with postpartum uterine disease or repeat breeding. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 952–958, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.018>.

LEE, H. et al. Dexamethasone downregulates SIRT1 and IL6 and upregulates EDN1 genes in stem cells derived from gingivae via the AGE/RAGE pathway. **Biotechnology Letters**, v. 40, n. 3, p. 509–519, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2493-0>.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 137 p.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 61, n. 2, p. 255–265, 2011.

PRAPAIWAN, N. et al. Expression of oxytocin, progesterone, and estrogen receptors in the reproductive tract of bitches with pyometra. **Theriogenology**, v. 89, p. 131–139, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.016>.

PREVIATO, P. F. G. P. et al. Alterações morfológicas nos órgãos genitais de cães e gatos provenientes de vilars rurais da região de Umuarama-PR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 8, n. 2, p. 105–110, 2005.

SAUT, J. P. E. et al. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS in vitro. **Reproduction**, v. 148, n. 6, p. 593–606, 2014. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0230>.

SHELDON, I. M.; ROBERTS, M. H. Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–10 e12906, 2010.

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**, v. 84, n. 1, p. 66–74, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.10.004>.

SILVA, E. et. al. Oestrous cycle-related changes in production of Tool-like receptors and prostaglandins in the canine endometrium. **Journal of Reproductive Immunology**, v.96, n. 1-2, p. 45-57, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.07.003>.

SLATTER D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2007. cap. 98. p. 1487-1520. 2896 p.

STADLER, K. et al. A three-dimensional culture model of canine uterine glands. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 45, n. 1/2, p. 35–43, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11626-008-9127-8>.

STALLIVIERE, F. M. et al. Helmintos intestinais em cães domiciliados e aspectos socioeconômicos e culturais das famílias proprietárias dos animais de Lages, SC, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, p. 22–27, 2013.

SUTHERS–McCABE, H. M. Take one pet and call me in the morning. **Generations**, v. 25, n. 2, p. 93–95, 2001.

TURNER, M. L.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Immunity and inflammation in the uterus microbial infection of the uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 402–409, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02104.x>.

VOORWALD, F. A. et al. Molecular expression profile reveals potential biomarkers and therapeutic targets in canine endometrial lesions. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–17 e0133894, 2015.

YE, Q. et al. Interleukin 12, interleukin 18, and tumor necrosis factor a release by alveolar macrophages: acute and chronic hypersensitivity pneumonitis. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 102, n. 2, p. 149–154, 2009. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60246-3](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60246-3).

ANEXOS

Anexo A – Normas para publicação revista Bioscience Journal

DIRETRIZES PARA AUTORES

This journal is not accepting submissions at this time.

A redação deve primar pela clareza, brevidade e concisão. O texto deve ser digitado em fonte Times New Roman, tamanho 11, espaço simples e com margem de, no mínimo, 2 cm. Todas as linhas deverão ser numeradas. Os trabalhos deverão ser apresentados sem identificação de autores. Os nomes dos autores, titulação e endereço de trabalho deverão ser apresentados nos metadados da submissão e, na carta de encaminhamento. Figuras e tabelas deverão ser inseridas no texto, o mais próximo possível de sua citação.

O artigo será encaminhado a três (03) revisores da área, no menor tempo possível, sem a identificação dos autores e, será considerado aprovado com 02 pareceres favoráveis.

Serão aceitos somente trabalhos redigidos em inglês, com apresentação de certificado de revisão feito por um expert na língua inglesa.

A revista se reserva o direito de efetuar alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical nos originais, com vistas a manter o padrão culto da língua, respeitando, porém, o estilo dos autores. As provas finais serão enviadas aos autores, juntamente com o boleto para pagamento da publicação.

Os trabalhos publicados passarão a ser propriedade da revista Bioscience Journal, ficando sua reimpressão, total ou parcial, sujeita à autorização expressa da direção da revista. Deve ser consignada a fonte de publicação original.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis para impressão, no formato PDF, no endereço eletrônico da revista.

Será cobrada taxa de publicação, no valor de R\$ 40,00 (quarenta reais) por página publicada, dos trabalhos aprovados, para autores nacionais e \$ 40 (quarenta dólares) para autores estrangeiros. (A forma de pagamento será informada posteriormente).

Após a avaliação e aprovação do artigo, a revista classificará as colaborações de acordo com as seguintes categorias:

1. Artigos originais - Artigos que apresentem contribuição inteiramente nova ao conhecimento e permitam que outros investigadores, baseados no texto escrito, possam julgar as conclusões, verificar a exatidão das análises e deduções do autor e repetir a investigação se assim o desejarem. Devem conter: Título, Resumo (com 200 a 400 palavras) e Palavras-chave em Inglês, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão) e Conclusão (opcional), Agradecimentos (se couber). Título, Resumo (com 200 a 400 palavras) e Palavras-chaves em português e Referências. Os trabalhos não devem exceder a 20 páginas (incluindo texto, referências, figuras e anexos).
2. Artigos de Revisão – Artigos que apresentem revisão ampla e atualizada de assunto de interesse

da comunidade científica e que ofereçam contribuição significativa para a área de conhecimento abordada. Devem conter: Título, Resumo (com 200 a 400 palavras) e Palavras-chave em inglês, Introdução, Desenvolvimento, Conclusão, Agradecimentos (se couber). Título, Resumo (com 200 a 400 palavras) e Palavras-chaves em português e Referências. Os trabalhos não devem exceder a 30 páginas (incluindo texto, referências, figuras e eventuais anexos). Nesta categoria de trabalho só serão aceitas para submissão contribuições feitas a convite dos editores (Geral ou Associados).

3. Relato de caso(s) - Artigos predominantemente clínicos, de alta relevância e atualidade, com relatos originais das áreas clínica e básica. Devem conter: Título, Resumo (com 200 a 400 palavras) e Palavras-chave em inglês, Introdução, Relato do caso, Discussão, Conclusão(opcional), Agradecimentos (caso necessário). Título, Resumo (com 200 a 400 palavras) e Palavras-chaves em português e Referências. Os trabalhos não devem exceder 10 páginas, (incluindo texto, referências, figuras e eventuais anexos)

4. Comunicação - Artigo não original, demonstrando a experiência de um grupo ou de um serviço, abrangendo preferencialmente ensino, pesquisa, políticas de saúde e exercício profissional. Ou ainda, que relate os resultados (parciais ou não) de trabalho que ofereça informações relevantes para o conhecimento científico, mas não permitam conclusões robustas. Deve conter: Título, Resumo (com 200 a 400 palavras) e Palavras-chave em inglês, Introdução, Conteúdo, Agradecimentos (caso necessário). Título, Resumo (com 200 a 400 palavras) e Palavras-chaves em português e Referências. Os trabalhos não devem exceder 10 páginas, incluídos os anexos.

Apresentação dos Trabalhos

Formato: Todas as colaborações devem ser enviadas por meio do Sistema Eletrônico de Editoração de Revista – SEER, endereço:

<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions#onlineSubmissions>

O texto deve estar gravado em extensão RTF (Rich Text Format) ou em formato Microsoft Word (2010). Os metadados deverão ser obrigatoriamente preenchidos com o título do trabalho, nome(s) do(s) autor(es), último grau acadêmico, instituição que trabalha, endereço postal, telefone, fax e e-mail.

O texto será escrito cordialmente, com intercalação de tabelas e figuras, já inseridas no texto, em quantidade mínima necessária para a sua compreensão.

No corpo do trabalho não deverá constar os nomes dos autores, que deverão ser encaminhados separadamente, com dados pessoais (títulos, endereço para correspondência, e-mail e Instituição a que está ligado), como medida de sigilo.

Título do trabalho: O título deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo as palavras-chave que representem o conteúdo do texto separadas por ponto, ambos acompanhados de sua tradução para o português.

Resumo: Deve ser elaborado um resumo informativo com cerca de 200 a 400 palavras, incluindo objetivo, método, resultado, conclusão, acompanhado de sua tradução para o português. Ambos devem ter, no máximo, 800 palavras.

Palavras-chave: As palavras-chave e keywords não devem repetir palavras do título, devendo-se incluir o nome científico das espécies estudadas. As palavras devem ser separadas por ponto e

iniciadas com letra maiúscula. Os autores devem apresentar de 3 a 6 termos, considerando que um termo pode ser composto de duas ou mais palavras.

Agradecimentos: Agradecimentos a auxílios recebidos para a elaboração do trabalho deverão ser mencionados no final do artigo, antes das referências.

Notas: Notas contidas no artigo devem ser indicadas com um asterisco imediatamente depois da frase a que diz respeito. As notas deverão vir no rodapé da página correspondente.

Excepcionalmente poderão ser adotados números para as notas junto com asteriscos em uma mesma página, e nesse caso as notas com asteriscos antecedem as notas com número, não importando a ordem dessas notas no texto. **Apêndices:** Apêndices podem ser empregados no caso de listagens extensivas, estatísticas e outros elementos de suporte.

Figuras e tabelas: Fotografias nítidas (preto e branco ou em cores), gráficos e tabelas em preto e branco (estritamente indispensáveis à clareza do texto) serão aceitos, e deverão ser assinalados, no texto, pelo seu número de ordem, nos locais onde devem ser intercalados. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte. (vide normas para elaboração de figuras, na próxima seção).

Os manuscritos, ainda que apresentem relevância científica e estejam metodologicamente corretos, poderão ser recusados se não apresentarem a devida organização e se estiverem fora das normas da Bioscience Journal.

NORMAS PARA ELABORAÇÃO DE FIGURAS

1. As figuras podem ser feitas em softwares de preferência dos autores (Excel, Sigma Plot, etc.), devendo ser inseridas e enviadas em formato TIFF ou JPG com resolução mínima de 300 dpi.

2. As figuras deverão ter largura máxima de 8,0 cm ou 16,0 cm.

3. Os títulos e a escala dos eixos x e y deverão ser em Times New Roman tamanho 11. As linhas dos eixos e demais linhas (e.g., curvas de regressão) deverão ter espessura de 0,3 mm. Todas as informações contidas no interior da figura (e.g., equações, legendas) deverão ser em Times New Roman tamanho 10 ou no mínimo 8. São dispensáveis as bordas, direita e superior, em gráficos.

4. Todas as figuras deverão ser inseridas convenientemente no texto logo após a sua chamada, consecutivamente e em números arábicos. As figuras deverão ser inseridas no texto por meio do comando “Inserir→Imagem/Figura→Arquivo”.

5. As figuras podem ser constituídas por múltiplos gráficos, tanto na horizontal como na vertical, respeitando a largura máxima de 16,0 cm e 8,0 cm, respectivamente. Quando se tratar de figuras com vários gráficos, os mesmos deverão ser identificados por letras (A, B, C, D) em maiúsculo entre parênteses, fonte Times New Roman tamanho 11. Trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto são da responsabilidade do autor.

Informação oriunda de comunicação pessoal, trabalhos em andamento e os não-publicados não devem ser incluídos na lista de referências, mas indicados em nota de rodapé da página em que forem citados.

Referências: NBR 6023/2002. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto são da responsabilidade do autor. Informação oriunda de

comunicação pessoal, trabalhos em andamento e os não publicados não devem ser incluídos na lista de referências, mas indicados em nota de rodapé da página onde forem citados.

As referências incluídas no final de cada artigo devem ser escritas em páginas separadas do texto principal, em ordem alfabética de acordo com as normas da ABNT NBR-6023, ago. 2002. Na lista de Referências, no final do artigo, todos os autores devem ser mencionados. Não é permitido o uso da expressão et al.

Observar os exemplos das referências abaixo:

Livro no todo:

GRAZIANI, Mário. Cirurgia buco-maxilo-facial. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. 676 p.

Capítulo de livro sem autoria própria:

PERRINS, C. M. Social systems. In: _____. Avian ecology. Glasgow: Blackie, 1983. cap. 2, p. 7-32.

Capítulo de livro com autoria própria:

GETTY, R. The Gross and microscopic occurrence and distribution of spontaneous atherosclerosis in the arteries of swine. In: ROBERT JUNIOR.; A., ATRAUSS, R. (Ed.). Comparative atherosclerosis. New York: Harper & Row, 1965. p. 11-20.

Monografias, Dissertações e Teses:

CORRALES, Edith Alba Lua Segovia. Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. 1997. 84 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1997.

Trabalhos apresentados em eventos: Congressos, Seminários, Reuniões...

NOVIS, Jorge Augusto. Extensão das ações de saúde na área rural. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 7., 1980, Brasília. Anais... Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1980. p. 37-43.

Artigos de periódicos:

COHEN, B. I.; CONDOS, S.; DEUTSCH, A. S.; MUSIKANT, B. L. La fuerza de fractura de tres tipos de materiales para el muñon en combinacion com tres espigas endodontiacales distintas. R. Cent. C. Biomed. Univ. Fed. Uberlândia, Uberlândia, v. 13, n. 1, p. 69-76, dez. 1997.

Obs.: Quanto ao título de periódicos, deve-se adotar um único padrão. Na lista de Referências todos os títulos de periódicos devem vir abreviados ou todos por extenso e, em negrito.

Nota:

Quando se tratar de documento eletrônico, deve-se fazer a referência normal, acrescentando-se ao final informações sobre a descrição do meio ou suporte.

Exemplo:

Capítulo de livro com autoria própria disponível em CD-ROM:

FAUSTO, A. I. da F.; CERVINI, R. (Org.). O trabalho e a rua. In: BIBLIOTECA nacional dos direitos da criança. Porto Alegre: Associação dos Juizes do Rio Grande do Sul, 1995. 1 CD-ROM.

Artigo de periódicos em meio eletrônico:

ROCHA-BARREIRA, C. A. Caracterização da gônada e ciclo reprodutivo da *Collisella subrugosa* (Gastropoda: Acmaeidae) no Nordeste do Brasil. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 62, n. 4b, nov. 2002. Disponível em: Acesso em: 20 abr. 2003.

Recomendações: Recomenda-se que se observem as normas da ABNT referentes à apresentação de artigos em publicações periódicas (NBR 6023/2002), apresentação de citações em documentos (NBR 10.520/2002), apresentação de originais (NBR 12256), norma para datar (NBR 5892), numeração progressiva das seções de um documento (6024/2003) e resumos (NBR 6028/2003), bem como a norma de apresentação tabular do IBGE.

Transferência de Direitos Autorais:

Todas as pessoas relacionadas como autores devem assinar a Transferência de Direitos Autorais:

“Declaro que, em caso de aceitação do artigo, a Bioscience Journal passa a ter os direitos autorais a ele referentes, que se tornarão propriedade exclusiva da Revista, vedado a qualquer reprodução, total ou parcial, em qualquer outra parte ou meio de divulgação, impressa ou eletrônica, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e, se obtida, farei constar o competente agradecimento à Revista.

Assinaturas do(s) autor(es) Data ____/____/____

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Declaração de Responsabilidade:

Todas as pessoas relacionadas como autores devem assinar a declaração de responsabilidade nos termos abaixo:

- Certifico que participei da concepção do trabalho para tornar pública minha responsabilidade pelo seu conteúdo, não omitindo quaisquer ligações ou acordos de financiamento entre os autores e companhias que possam ter interesse na publicação deste artigo;
- Certifico que o manuscrito é original e que o trabalho, em parte ou na íntegra, ou qualquer outro trabalho com conteúdo substancialmente similar, de minha autoria, não foi enviado a outra Revista e não o será, enquanto sua publicação estiver sendo considerada pela Bioscience Journal, quer seja no formato impresso ou no eletrônico.

Endereço para envio de trabalhos:

<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions#onlineSubmissions>

CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. Serão aceitos somente trabalhos redigidos em inglês.

A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; não sendo o caso, justificar em "Comentários ao Editor". _____

2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word (2010), RTF ou WordPerfect.
3. O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 11-pontos; emprega *itálico* ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final.
4. A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo (word) e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista. O texto cumpre com as normas de formatação da revista citados em “Diretrizes para os autores” na seção “Sobre”.
5. No momento da submissão on line, o autor principal deverá enviar um ofício assinado por todos os autores, solicitando a submissão do artigo e a sua possível publicação, exclusivamente nesta revista. O ofício deverá ser digitalizado e transferido em "documentos suplementares".
6. Todos os endereços "URL" no texto (ex.: <http://pkp.ubc.ca>) estão ativos.
7. O artigo está sendo submetido corretamente na seção correspondente, de acordo com a sua área.
8. Os manuscritos mesmo apresentando relevância científica e estando metodologicamente corretos poderão ser recusados se apresentados de forma desorganizada e fora das normas da Bioscience Journal. Manuscritos bem escritos e apresentados de acordo com as normas são revisados com maior rapidez e, também, exigindo menor esforço dos revisores.
9. Será cobrada taxa de publicação, no valor de R\$ 40,00 (quarenta reais) por página publicada, dos trabalhos aprovados, para autores nacionais e \$ 30 (trinta dólares ou 30 euros) para autores estrangeiros (A forma de pagamento será informada posteriormente).
10. Todos os itens acima são requisitos básicos para a submissão de um artigo e, caso não estejam de acordo com as normas da revista, ou os metadados não estejam preenchidos corretamente, o referido artigo NÃO SERÁ considerado para avaliação.

DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL

Os direitos autorais para artigos publicados nesta revista são do autor, com direitos de primeira publicação para a revista. Em virtude de aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços de email neste site serão usados exclusivamente para os propósitos da revista, não estando disponíveis para outros fins.

TAXAS PARA AUTORES

Este periódico cobra as seguintes taxas aos autores.

Taxa para publicação: 40,00 (BRL)

Será cobrada taxa de publicação, no valor de R\$ 40,00 (quarenta reais) por página publicada, dos trabalhos aprovados, para autores nacionais e \$ 40 (40 dólares ou 40 euros) para autores estrangeiros. (A forma de pagamento será informada posteriormente).