

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

SARA PEDROSA FRANCO BARBOSA

**PRODUÇÃO DAS INTERLEUCINAS 6 E 12 EM CULTURAS DE ENDOMÉTRIOS
CANINOS *EX VIVO* COM E SEM INFLAMAÇÃO DESAFIADAS COM
LIPOPOLISSACARÍDEO**

UBERLÂNDIA – MG

2018

SARA PEDROSA FRANCO BARBOSA

**PRODUÇÃO DAS INTERLEUCINAS 6 E 12 EM CULTURAS DE ENDOMÉTRIOS
CANINOS *EX VIVO* COM E SEM INFLAMAÇÃO DESAFIADAS COM
LIPOPOLISSACARÍDEO**

Trabalho apresentado à banca examinadora
como requisito à aprovação na disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso II da
graduação em Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut

UBERLÂNDIA – MG

2018

**PRODUÇÃO DAS INTERLEUCINAS 6 E 12 EM CULTURAS DE ENDOMÉTRIOS
CANINOS *EX VIVO* COM E SEM INFLAMAÇÃO DESAFIADAS COM
LIPOPOLISSACARÍDEO**

Trabalho apresentado à banca examinadora
como requisito à aprovação na disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso II da
graduação em Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia.

Aprovado em 04 de dezembro de 2018.

Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut
Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Aracelle Elisane Alves
Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos
Universidade Federal de Uberlândia

Dedico este trabalho aos meus pais que ao longo de toda minha vida fizeram o melhor para me oferecer as oportunidades de uma formação acadêmica de qualidade, sempre me apoiaram na realização deste sonho de me tornar médica veterinária e me presentearam diariamente com seu incessante amor.

AGRADECIMENTOS

“Que a paz de Cristo seja o juiz em seu coração, visto que vocês foram chamados para viver em paz, como membros de um só corpo. E sejam agradecidos.” Colossenses 3:15

Ao longo desses quatro anos e meio de faculdade e em especial esses dois últimos anos em que fiz parte da equipe LASGRAN posso dizer que cresci muito não apenas no aspecto profissional, mas também no aspecto pessoal. Sei que cada um que passou por minha vida ao longo desse tempo deixou lições valiosas para mim, me fez ser quem eu sou, me ensinou a ser mais forte, mais resiliente, mais responsável, mais dedicada. E por tudo que vivi até este momento só tenho a agradecer!

Agradeço primeiramente a Deus por estar comigo em todos os momentos, por ser meu melhor amigo e por ter me capacitado a chegar até aqui. A Ele minha eterna e imensurável gratidão, pois reconheço que nenhuma conquista seria possível se não fosse por seu infinito amor e maravilhosa graça que me sustentaram e motivaram ao longo de toda essa jornada acadêmica.

Agradeço aos meus pais, Walter e Scheila, por terem sido meu alicerce durante todas as fases pelas quais já passei. Sei que estou concluindo este projeto e esta etapa da minha vida acadêmica porque um dia vocês sonharam com isso e me ensinaram a lutar pelos meus objetivos e a acreditar que eu poderia alcançá-los. Vocês me incentivaram dia após dia a tornar-me uma pessoa melhor, me amaram da melhor forma que um filho pode ser amado e nunca mediram esforços para investir na minha educação, meu coração é grato por tê-los ao meu lado sempre.

Agradeço ao meu irmão, Mateus, por ser meu maior exemplo. Você me ensinou que com esforço e dedicação conquistamos muito mais do que imaginamos. Agradeço também ao meu cãozinho Katu, minha maior inspiração para tornar-me médica veterinária, por ser meu companheiro e me ensinar que na simplicidade é que encontramos a mais nobre beleza da vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut por todos os ensinamentos e pela confiança depositada em mim ao longo desses anos, sempre me incentivando a buscar mais conhecimento e criar estratégias para contornar problemas e superar desafios.

Agradeço à minha coorientadora MSc. Layane Queiroz Magalhães por ter me recebido de braços abertos, me ensinado a prática da pesquisa e por fazer do LASGRAN um lar para mim. Agradeço a todos da equipe LASGRAN, em especial às doutorandas Paula Batista e Amanda Rezende pelo grande auxílio nos experimentos, e à graduanda Mariana Almeida por estar sempre disposta a colaborar e por ser essa pessoa amiga e companheira. Agradeço aos

colegas Alisson, Antônio, Meire, Dayane e Rafaela pela contribuição na realização dos experimentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Geison Morel Nogueira por ter me acolhido tão bem e por estar sempre disposto a compartilhar suas experiências e me ensinar lições preciosas com a simples convivência.

Agradeço à Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos e à equipe do Laboratório de Reprodução Animal da UFU por deixarem o laboratório à disposição para a realização de algumas etapas do experimento. Agradeço à Profa. Aracelle por ter sido solícita a colaborar sempre que necessário. E agradeço a ambas por aceitarem o convite para a banca examinadora deste trabalho de conclusão de curso.

Agradeço às equipes do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, do Laboratório de Doenças Infecciosas e do Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia por cederem materiais para a realização dos experimentos. Agradeço também à equipe do Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley da Universidade Estadual de Londrina pela colaboração na avaliação histológica das amostras. Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Vicente Mundim pela ajuda na coordenação deste projeto. E agradeço à equipe do Hospital Veterinário UFU por contribuírem nas coletas dos dados e amostras para este trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia pelas oportunidades de aprendizado proporcionadas ao longo desses anos de graduação no curso de medicina veterinária, principalmente por me permitir participar do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), mediante o qual pude realizar esta pesquisa. Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica concedida.

Agradeço aos meus colegas de turma por todo o companheirismo ao longo da graduação, em especial à minha amiga Lana que tanto me apoiou durante esses anos, sua compreensão e carinho foram essenciais para mim, obrigada por tudo!

Agradeço a todos os animais que fizeram parte deste experimento. É pensando em aperfeiçoar o conhecimento científico e melhorar os cuidados para com nossos pacientes que a pesquisa ganha sentido.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.”

(Provérbios 16:3)

RESUMO

As interleucinas 6 (IL6) e 12 (IL12B) são citocinas pró-inflamatórias que estimulam a síntese de outros mediadores inflamatórios e promovem a ativação e maturação de células de defesa. *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), como o lipopolissacarídeo (LPS), se ligam aos receptores *toll-like* (TLR), ativando vias que levam à síntese dessas citocinas e de outras moléculas inflamatórias que participam de forma conjunta da resposta imune contra agentes infecciosos. Em cadelas, algumas afecções uterinas como endometrite, hiperplasia endometrial cística e piometra têm grande relevância clínica. No presente estudo, avaliou-se a produção de IL6 e IL12B por meio de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sanduíche em culturas de endométrios caninos *ex vivo* desafiadas com LPS. As amostras foram histologicamente classificadas em quatro grupos: sem inflamação, inflamação aguda, inflamação subaguda e inflamação crônica. Os resultados revelaram que o desafio com LPS não desencadeou acúmulo significativo de IL12B e principalmente de IL6 no sobrenadante das culturas de endométrios caninos *ex vivo* inflamados, indicando que cadelas clinicamente saudáveis que apresentam infiltrado inflamatório no endométrio podem ter comprometimento da resposta imune inata uterina frente à infecção bacteriana, contribuindo para o estabelecimento da piometra.

Palavras-chave: Cadelas. Citocinas. Inflamação. Imunidade uterina. Piometra

ABSTRACT

The interleukins 6 (IL6) and 12 (IL12B) are proinflammatory cytokines that stimulate the synthesis of other inflammatory mediators and promote the activation and maturation of defense cells. *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), such as lipopolysaccharides (LPS), bind to toll-like receptors (TLR), activating pathways that trigger the release of cytokines and other inflammatory molecules which participate together in the immune response against infectious agents. In bitches, some uterine conditions such as endometritis, cystic endometrial hyperplasia and pyometra have great clinical relevance. The synthesis of IL6 and IL12B in *ex vivo* canine endometrium cultures challenged with LPS was evaluated by sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The samples were histologically classified into four groups: without inflammation, acute inflammation, subacute inflammation and chronic inflammation. Results revealed that the challenge with LPS did not trigger a significative accumulation of IL12B and especially IL6 in the supernatant of inflamed *ex vivo* canine endometrium cultures, what can indicate that clinically healthy bitches with inflammatory infiltrates in endometrium may present a compromised uterine innate immune response against bacterial infection, contributing to the establishment of pyometra.

Keywords: Bitches. Cytokines. Inflammation. Pyometra. Uterine immunity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Objetivos.....	11
1.1.1 Objetivo geral.....	11
1.1.2 Objetivos específicos.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Aspectos gerais de imunologia	12
2.2 Inflamação	14
2.2.1 Resposta inflamatória aguda, subaguda e crônica.....	14
2.2.2 Cascata da inflamação.....	16
2.2.3 Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica e sepse	16
2.3 Imunidade e morfologia do útero.....	17
2.4 Importantes afecções uterinas relacionadas à inflamação	19
2.4.1 Endometrite	19
2.4.2 Complexo Hiperplasia Endometrial Cística-Piometra	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Animais e coleta de amostras.....	23
3.2. Delineamento experimental	23
3.3 Processamento das amostras	24
3.4 Realização do ELISA.....	26
3.5 Avaliação histopatológica.....	27
3.6 Análise Estatística.....	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Animais e histórico reprodutivo	29
4.2 ELISA	29
4.3 Avaliação histopatológica das amostras	31
5. DISCUSSÃO.....	33
6. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

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).

Portanto, é indispensável a busca pelo aprimoramento das diversas áreas da medicina veterinária, a fim de garantir maior expectativa e qualidade de vida para os animais domésticos. Para isso, é necessário investir em pesquisas que permitam compreender melhor diferentes patologias que acometem esses animais.

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 que elas atinjam dez anos de idade (EGENVALL et al., 2001) e outro estudo realizado no Brasil por Silveira et al. (2013) constatou que a piometra foi a anormalidade reprodutiva mais diagnosticada no período de um ano, dentre os casos atendidos em um hospital veterinário escola. No entanto, a patogenia dessa afecção uterina ainda não está completamente elucidada.

Muitos estudos associam sua ocorrência à presença da hiperplasia endometrial cística (HEC), sendo esta condição considerada um fator predisponente ao estabelecimento da piometra (SILVA et al., 2010; VOORWALD et al., 2015). Porém, não há estudos 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.

Por essa razão, considerou-se relevante avaliar a relação entre a presença de infiltrado inflamatório no endométrio de cadelas e a produção de citocinas pró-inflamatórias no endométrio canino, diante do desafio com lipopolissacarídeo (LPS). A hipótese do presente estudo é 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 e ocorrência de efeitos sistêmicos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da inflamação endometrial sobre a produção das interleucinas 6 (IL6) e 12 (IL12B) em culturas de endométrios caninos *ex vivo* desafiadas com LPS.

1.1.2 Objetivos específicos

Mensurar a produção das citocinas IL6 e IL12B no sobrenadante de culturas de endométrios caninos *ex vivo*, provenientes de úteros com e sem inflamação, após desafio *in vitro* com LPS durante 24 horas.

Avaliar se as concentrações de IL6 e IL12B variam de acordo com o tipo de infiltrado inflamatório presente no endométrio.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 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 superfícies 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 (RRP) 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 RRP e encontram-se expressos em macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células NK (WIRA et al., 2005), bem como em células epiteliais e estromais do endométrio (SHELDON; OWENS; TURNER, 2017). 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 LPS (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003).

O LPS é o principal glicolípídeo 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 IL6 e à interleucina IL12B, 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. A IL6 é uma glicoproteína de 22 a 28kDa que consiste no principal mediador da reação de fase aguda e do choque séptico (TIZARD, 2014). Trata-se de 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, 2014).

A síntese de IL6 ocorre em monócitos, células endoteliais, fibroblastos, mastócitos, linfócitos T e macrófagos em resposta à endotoxinas de microrganismos ou ao estímulo de outras citocinas, como interleucina 1 (IL1B) e fator de necrose tumoral (TNF). Tanto a IL6 quanto seu receptor 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 e a IL1B (RAU et al., 2007). Contudo, a IL6 também apresenta ação anti-inflamatória, uma vez que inibe algumas atividades de TNF e IL1B e promove a síntese de citocinas supressoras, como a interleucina 10 (IL10) (TIZARD, 2014).

A IL12B 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 (IFNG), 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 IL12B tem sido bastante estudada.

2.2 Inflamação

2.2.1 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 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 persistem na inflamação crônica, como a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade capilar. Porém, o tipo de leucócitos que migram 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 neutrofilico 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).

2.2.2 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 ciclooxigenase 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).

2.2.3 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 clínica veterinária como a principal causa de sepse, sendo o LPS a molécula mais potente em estimular a liberação de mediadores pró-inflamatórios, quando comparado aos 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).

2.3 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 múltiparas 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 a concentração de progesterona está aumentando 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).

No estudo realizado por Monteiro et al. (2009) observou-se 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 múltiparas, 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 múltiparas ou tratadas com contraceptivos e que a subcamada interna do miométrio de cadelas múltiparas ou tratadas com contraceptivos apresenta maior espessura que a de nulíparas.

2.4 Importantes afecções uterinas relacionadas à inflamação

2.4.1 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);

As fêmeas caninas apresentam ciclo estral composto por quatro fases, sendo elas: pró-estro, estro, diestro e anestro. A ovulação é espontânea e a fase luteínica apresenta duração aproximada de 64 dias, semelhantemente à gestação. As concentrações de progesterona (P4) durante o diestro alcançam níveis séricos elevados, variando de 15 a 80ng/mL. Portanto, mesmo que não haja concepção, o corpo lúteo permanece produzindo P4 por cerca de dois meses. Assim, acredita-se que problemas mamários e uterinos sejam mais comuns em cadelas que em outras espécies domésticas devido à sensibilidade à progesterona, à ausência de gestação frequente e ao uso de progestinas como contraceptivos (CONCANNON, 2010).

O ambiente uterino durante a fase luteínica é apropriado para a gestação, mas também para o crescimento microbiano. A P4 estimula o crescimento e proliferação de glândulas endometriais, aumenta a secreção, promove fechamento de cérvix e supressão das contrações miometriais. Além disso, a resposta dos leucócitos locais e a resistência uterina à infecção bacteriana reduzem (HAGMAN, 2018).

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).

2.4.2 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 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, gerando acúmulo de fluido no lúmen do útero, o que resulta 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 não castradas, 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 SRIS e sepse, sendo uma afecção que coloca em risco a vida das cadelas acometidas e, portanto, exige cuidados intensivos e imediatos (KARLSSON et al., 2012; HAGMAN, 2017).

O diagnóstico de piometra é dado pelo exame clínico e ultrassonográfico, pela avaliação macroscópica e histológica do útero e dos ovários, bem como pelo exame microbiológico do conteúdo uterino. Achados laboratoriais como leucocitose com neutrofilia e desvio à esquerda, monocitose, anemia normocítica, normocrômica e regenerativa, disfunção renal e aumento das concentrações de proteínas de fase aguda no sangue podem ser encontrados em casos de piometra. O tratamento cirúrgico denominado ovariosalpingohisterectomia (OSH) é o mais seguro e eficiente, uma vez que a fonte de infecção e os produtos bacterianos são removidos, evitando recidiva (HAGMAN, 2018).

Há também estratégias de tratamento clínico que visam minimizar os efeitos da P4 ao evitar sua produção ou ação, eliminar a infecção uterina, promover relaxamento de cérvix e expulsar o pus intraluminal, facilitando a recuperação do útero. Drogas frequentemente utilizadas são: prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) ou seu análogo sintético cloprostenol, agonistas dopaminérgicos, como a cabergolina e bromocriptina, ou bloqueadores dos receptores de progesterona, como o aglepristone (HAGMAN, 2018).

Muitos estudos têm sido realizados a fim de elucidar a real associação entre as afecções reprodutivas acima descritas 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, CXCL8 e outras citocinas no útero de cadelas com piometra, o que também foi observado por Bukowska 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 TLRs (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 e aperfeiçoamento dos tratamentos existentes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e coleta de amostras

Para a realização deste estudo foram coletados úteros de 42 fêmeas caninas clinicamente saudáveis submetidas a 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 em um intervalo de aproximadamente duas horas ao Laboratório de Saúde em Grandes Animais (LASGRAN) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) para o devido processamento.

Os dados referentes ao histórico reprodutivo das cadelas, bem como os parâmetros do exame físico geral foram obtidos a partir das fichas clínicas do projeto de controle populacional de animais de estimação pelo método de esterilização cirúrgica, e transferidos para planilhas específicas. 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.

3.2. Delineamento experimental

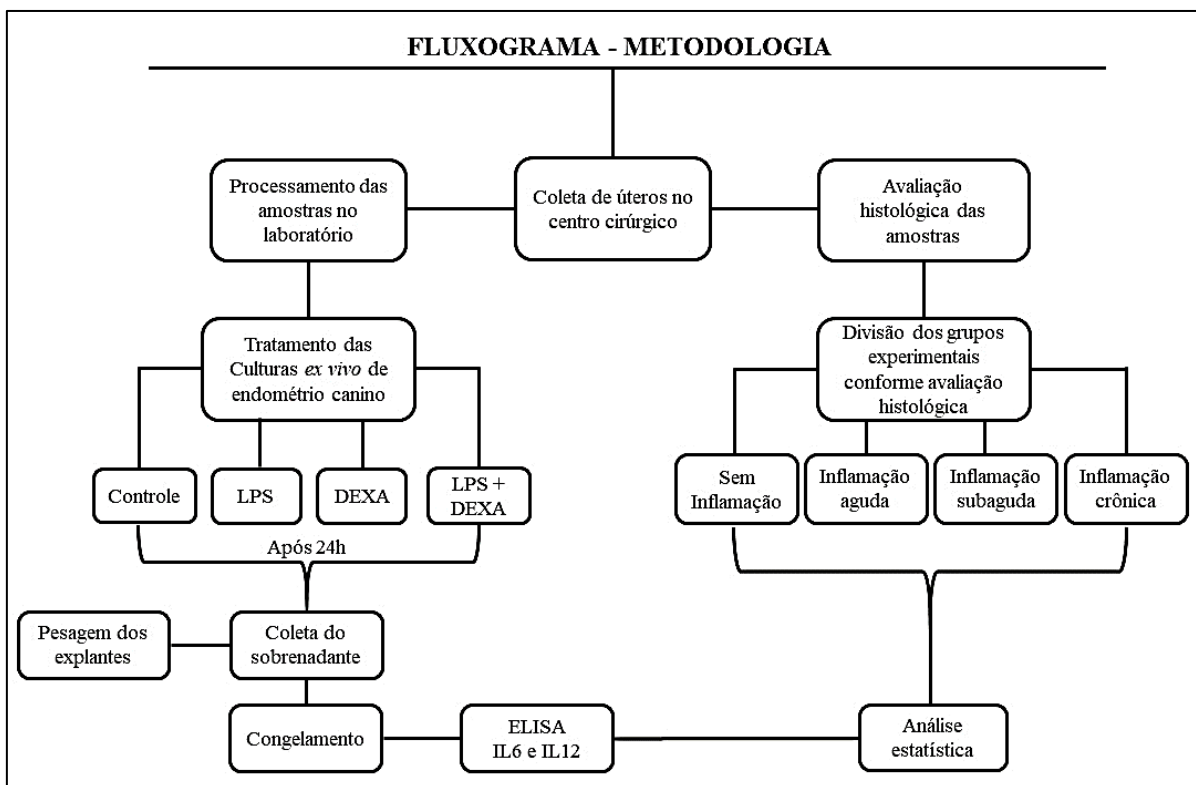
O delineamento experimental foi realizado conforme o fluxograma apresentado na figura 1, sendo que de cada útero coletado foram obtidas quatro amostras para cultivo *in vitro* e uma amostra para avaliação histopatológica.

No laboratório, cada amostra de endométrio canino *ex vivo* destinada ao cultivo *in vitro* foi exposta a um dos 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 *in vitro*, os sobrenadantes foram coletados e armazenados congelados para posterior realização de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para dosagem das citocinas IL6 e IL12B. Os símbolos dos mediadores inflamatórios utilizados neste estudo estão de acordo com HUGO *Gene Nomenclature Committee* (<https://www.genenames.org/>).

Já as amostras de endométrio destinadas ao exame histopatológico foram avaliadas e separadas em quatro grupos experimentais: a) grupo sem-inflamação; b) grupo inflamação aguda; c) grupo inflamação subaguda; d) grupo inflamação crônica. Esses grupos foram utilizados para posterior correlação estatística entre os dados referentes à produção de IL6 e IL12B no sobrenadante das culturas de endométrio canino *ex vivo* e as características histológicas das amostras.

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



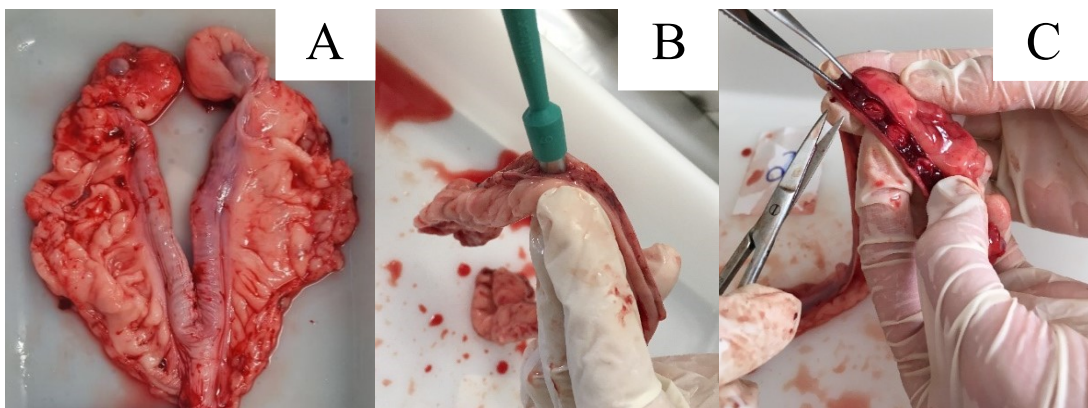
Fonte: LASGRAN – UFU, 2018.

3.3 Processamento das amostras

Após serem transportados ao laboratório, os úteros foram lavados externamente com álcool 70% (Fig. 2A). 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, Healey e Sheldon (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 endométrio (Fig. 2B), denominados explantes, utilizando-se *punch* estéril de 6mm para biópsia (Kruuse, Langeskov, Denmark), os quais foram destacados com auxílio de pinça e tesoura (Fig. 2C) 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, de cada útero foi coletado uma amostra para exame histopatológico, o qual foi acondicionado em recipiente contendo formol 10%.

Figura 2. A: Útero de cadela coletado após OSH. B: Delimitação da amostra de endométrio para cultivo *in vitro* com punch de biópsia. C: Retirada da amostra de endométrio com pinça e tesoura.



Fonte: LASGRAN - UFU, 2018.

Os explantes foram levados à cabine de fluxo laminar, 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 cultivo celular com 24 poços (Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brasil) com 2 mL de meio completo de cultivo 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.

Quatro explantes foram coletados de cada útero 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 simultaneamente com soluções de LPS 1µg/mL (InvivoGen) e 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 individualmente 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 IL12B por meio de ELISA.

3.4 Realização do ELISA

As concentrações de IL6 e IL12B presentes no sobrenadante de cada amostra foram mensuradas pela técnica de ELISA sanduíche, 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 IL12B o kit DuoSet ELISA Development Systems Canine IL-12/IL-23 p40 (R&D Systems®). Ambos os kits apresentam *assay range* de 62,5 a 4.000 pg/mL.

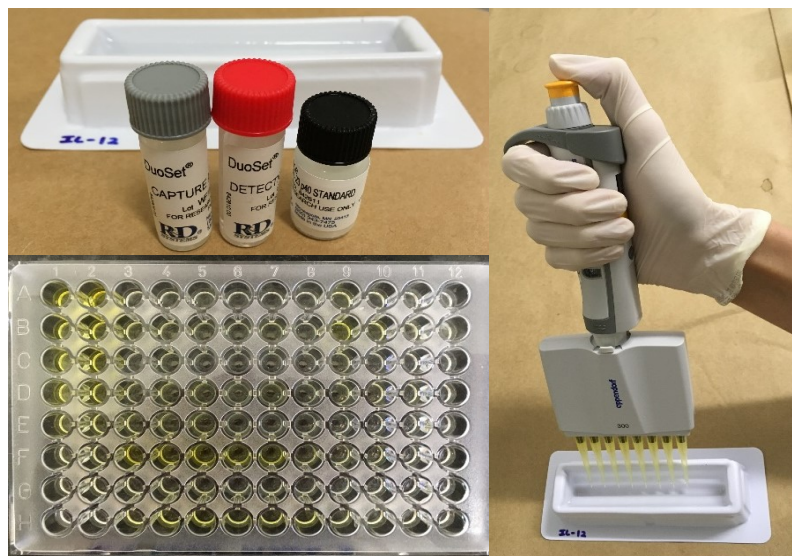
Primeiramente as placas de ELISA eram sensibilizadas com anticorpo de captura diluído em solução *Phosphate Buffered Saline* (PBS) e permaneciam em temperatura ambiente *overnight*. No dia seguinte, as placas eram lavadas três vezes com *wash buffer*, em seguida era feito o bloqueio adicionando-se reagente 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 solução padrão eram adicionadas aos seus respectivos poços e as placas permaneciam em temperatura ambiente por duas horas.

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 sulfúrico) em cada poço e agitava-se cuidadosamente as placas.

Rapidamente transportava-se as placas, ao abrigo da luz, até o aparelho SpectraMax® M2/M2^e (Molecular Devices Corporation, San Jose, CA, USA) em que se fazia a 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. Algumas etapas do procedimento estão ilustradas na figura 3.

Figura 3. Realização de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para dosagem das concentrações de IL6 e IL12B.



Fonte: LASGRAN - UFU, 2018.

3.5 Avaliação histopatológica

Os fragmentos de endométrio destinados ao exame histopatológico foram fixados por imersão em solução 10% de formol, incluídos em parafina, seccionados a 50µm 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, e o tipo de célula inflamatória predominante no infiltrado; edema; hemorragia; e proliferação de fibroblastos.

Desse modo, a classificação histopatológica dos endométrios foi realizada com base na soma de dois fatores: achados histopatológicos observados e caracterização do infiltrado inflamatório.

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, caracterizado pela predominância de neutrófilos; c) grupo inflamação subaguda: amostras que histologicamente apresentaram infiltrado inflamatório misto, caracterizado pela predominância de neutrófilos degenerados e macrófagos reativos ou neutrófilos hipersegmentados, macrófagos e raros eosinófilos; d) grupo inflamação crônica: amostras que histologicamente apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear com predomínio de linfócitos e/ou macrófagos reativos.

3.6 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 elaboração dos gráficos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

As concentrações de IL6 e IL12B 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 $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Animais e histórico reprodutivo

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) eram de 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) pluríparas e 26,2% (11/42) sem histórico.

4.2 ELISA

As médias das concentrações (pg/mg) das citocinas IL6 e IL12B 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 2.

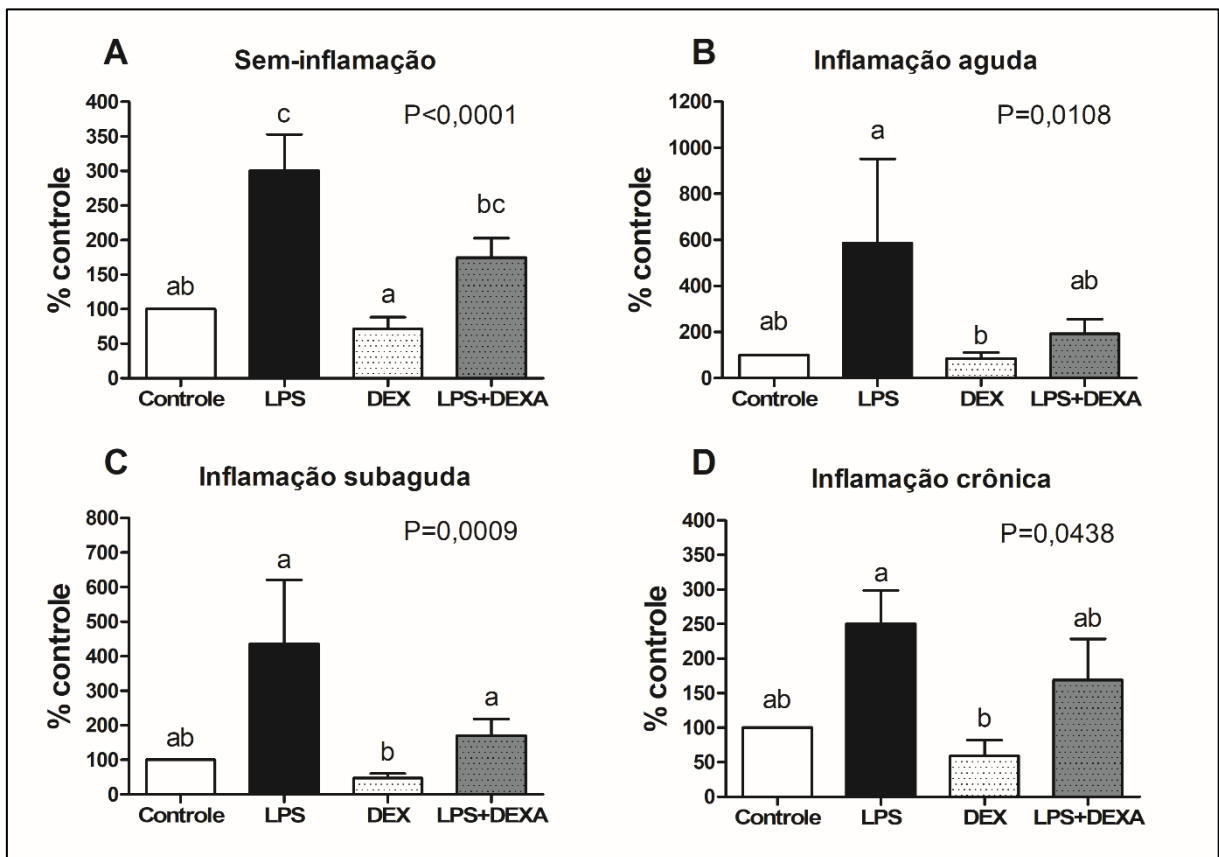
Tabela 2. Médias das concentrações das interleucinas 6 e 12 (pg/mg) no sobrenadante de culturas de endométrio canino *ex vivo* com diferentes graus de inflamação frente à exposição ao LPS e à dexametasona durante 24 horas + erro padrão da média.

		TRATAMENTOS			
		Controle	LPS	DEXA	LPS+DEXA
SEM-INFLAMAÇÃO	IL6	68,9 + 14,3	188,9 + 41,2	59,5 + 22,2	116,8 + 23,7
	IL12B	1,21 + 0,15	3,45 + 0,41	1,01 + 0,16	4,19 + 0,96
INFL. AGUDA	IL6	159,2 + 106,4	243,0 + 98,1	29,0 + 9,8	165,1 + 96,7
	IL12B	1,47 + 0,39	6,88 + 2,10	0,92 + 0,31	4,26 + 2,05
INFL. SUBAGUDA	IL6	130,2 + 53,5	260,3 + 60,7	60,9 + 36,1	222,2 + 58,6
	IL12B	2,42 + 0,90	7,99 + 4,62	4,02 + 3,19	5,45 + 2,77
INFL. CRÔNICA	IL6	70,8 + 35,4	126,2 + 38,4	34,2 + 23,4	98,8 + 60,9
	IL12B	1,20 + 0,44	3,66 + 1,38	1,04 + 0,57	3,84 + 1,20

Fonte: LASGRAN – UFU, 2018.

Quando expostos a $1\mu\text{g/mL}$ de LPS os explantes de endométrios sem-inflamação responderam significativamente com acúmulo de IL6 (Fig. 5A), no entanto, nos grupos em que havia a presença de inflamação (Fig. 5B-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.

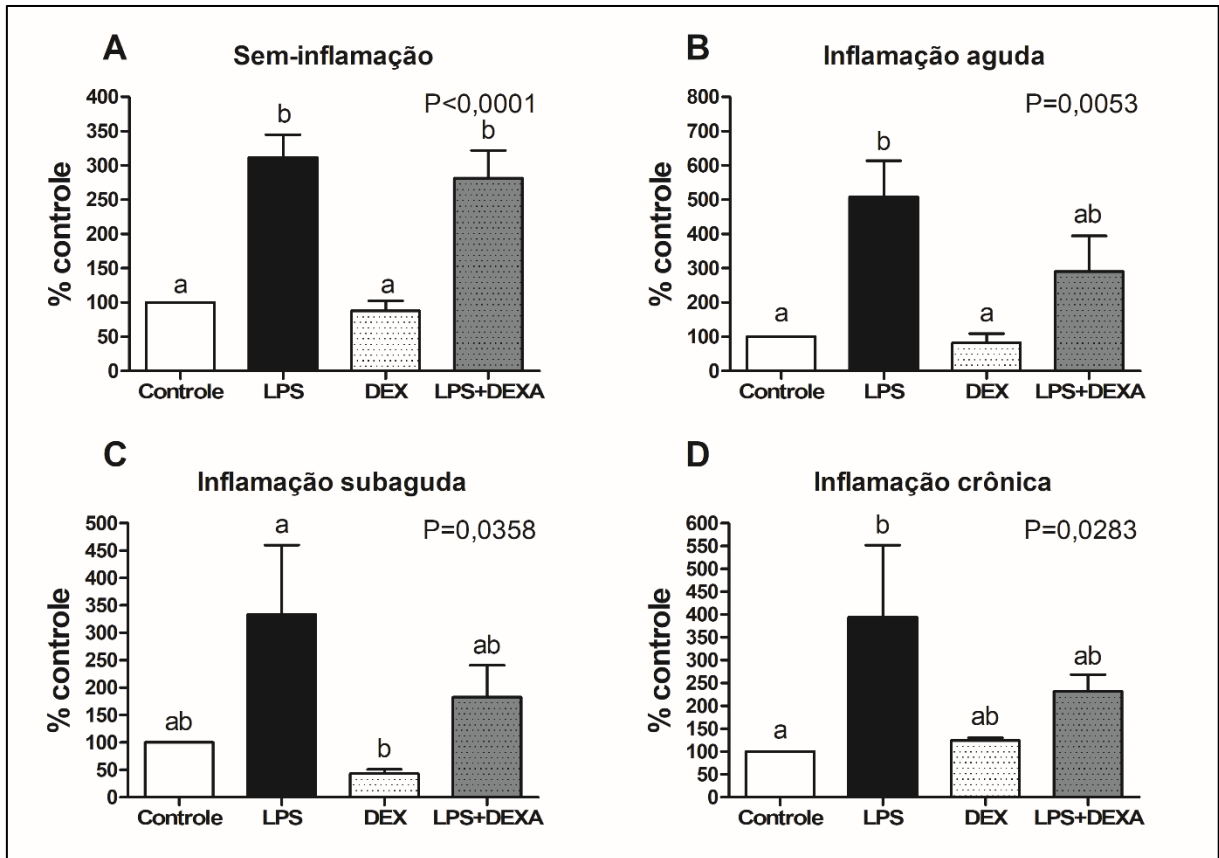
Figura 5. Resposta da interleucina 6 de culturas de endométrio canino *ex vivo* com diferentes graus de inflamação frente à exposição ao lipopolissacarídeo e à dexametasona durante 24 horas. Endométrios caninos foram agrupados conforme a ausência (A) ou presença de inflamação aguda (B), subaguda (C) e crônica (D). Os endométrios foram desafiados por 24h com meio controle (Controle) e meios contendo $1\mu\text{g/mL}$ 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 ($P<0,05$).



Fonte: LASGRAN – UFU, 2018

Os explantes de endométrios sem-inflamação (Fig. 6A), inflamação aguda (Fig. 6B) e inflamação crônica (Fig. 6D) quando expostos a $1\mu\text{g/mL}$ de LPS responderam significativamente com acúmulo de IL12B ($P<0,05$), no entanto, no grupo com endométrios apresentando inflamação subaguda (Fig. 6C) 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. 5).

Figura 6. 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 IL12B em relação ao controle e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn's ($P < 0,05$).

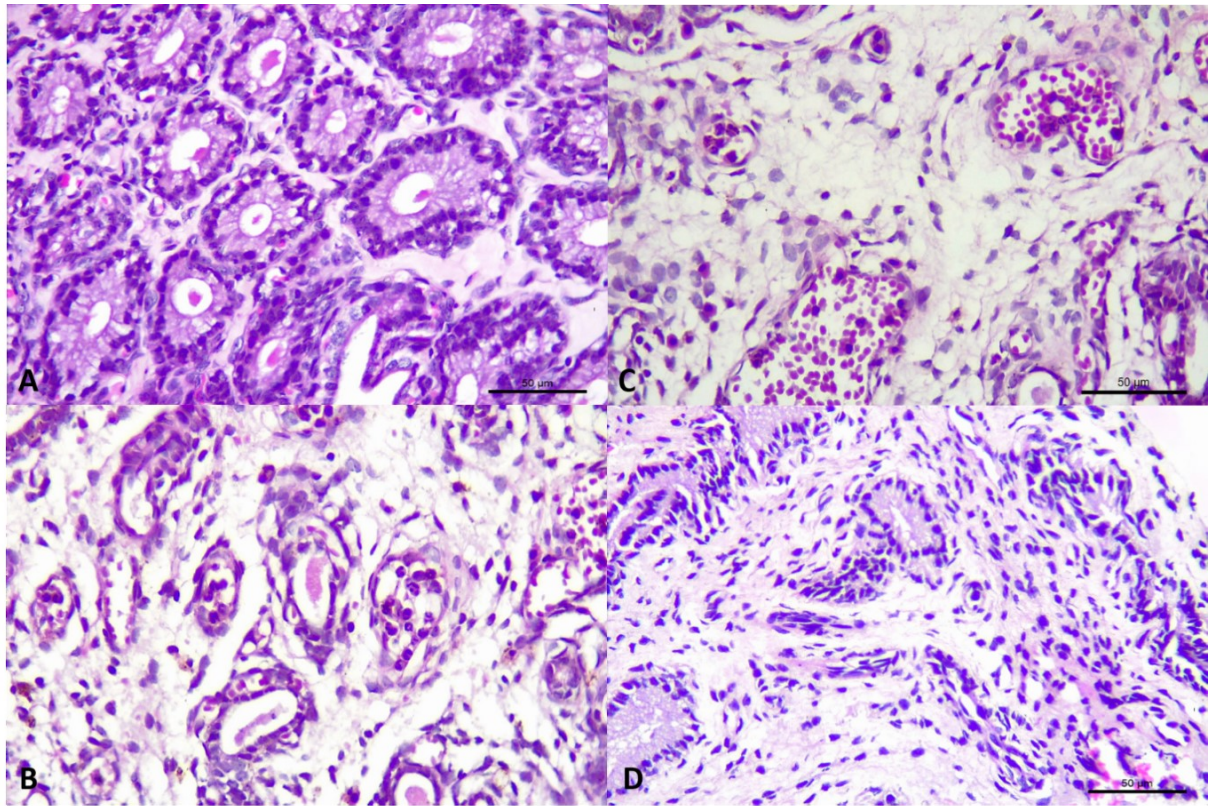


Fonte: LASGRAN – UFU, 2018

4.3 Avaliação histopatológica das amostras

Os 42 úteros coletados foram histologicamente avaliados e classificados em quatro grupos: a) sem-inflamação ($n=23$); b) inflamação aguda ($n=8$); c) inflamação subaguda ($n=6$); d) inflamação crônica ($n=4$). Uma amostra apresentou apenas infiltrado linfocítico, diferindo histologicamente das demais amostras, portanto, não foi incluída em nenhum grupo, além de não ter sido considerada na análise estatística. Uma amostra pertencente a cada um dos grupos histológicos está ilustrada na figura 4.

Figura 4. Fotomicrografias caracterizando amostras de endométrios caninos expostos a LPS e dexametasona: sem inflamação (A), inflamação aguda (B), inflamação subaguda (C) e inflamação crônica (D). Hematoxilina e eosina: barra, A-D, 50 μ m.



Fonte: LASGRAN – UFU, 2018.

Dentre as amostras avaliadas, 45,2% (19/42) apresentaram inflamação, sendo 42,1% (8/19) inflamação aguda, 31,6% (6/19) inflamação subaguda, 21,1% (4/19) inflamação crônica e 5,3% (1/19) inflamação linfocítica. Em relação ao total de amostras, as porcentagens de cada grupo histológico estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem de amostras de endométrio em cada grupo histológico determinada conforme presença ou ausência de inflamação e tipo de infiltrado inflamatório.

GRUPO HISTOLÓGICO	PORCENTAGEM
SEM-INFLAMAÇÃO	54,8% (23/42)
INFLAMAÇÃO AGUDA	19,0% (8/42)
INFLAMAÇÃO SUBAGUDA	14,3% (6/42)
INFLAMAÇÃO CRÔNICA	9,5% (4/42)

Nota. Uma amostra não foi incluída nos grupos experimentais por apresentar característica de infiltrado inflamatório distinta das demais amostras. Fonte: LASGRAN – UFU, 2018.

5. 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 no presente trabalho.

No estudo feito por Gifford, Scarlet e Schlafer (2014), observou-se 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 à idade da maioria dos animais ser superior a seis anos,

diferentemente deste estudo em que 73,8% (31/42) dos animais apresentaram idade igual ou inferior a três 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, este estudo 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 IL12B pelas culturas de endométrios caninos *ex vivo* que já apresentavam ou não infiltrado inflamatório. Observou-se que a porcentagem de acúmulo de IL6 e IL12B 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 resultou em 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 lipoteicoico (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 endometriais 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. 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 pelo presente estudo.

Kasimanickam et al. (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 et al. (2014) foram distintas das utilizadas no presente estudo.

Todavia, diferentemente do observado na dosagem de IL6, a porcentagem de acúmulo de IL12B foi significativamente maior ($P < 0,05$) no sobrenadante das culturas de endométrios caninos *ex vivo* dos grupos sem-inflamação, inflamação aguda e inflamação crônica, expostas a 1 µg/mL LPS, quando comparada à porcentagem de acúmulo de IL12B no sobrenadante das amostras dos grupos sem-inflamação, 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 IL12B, em comparação com a porcentagem de acúmulo de IL12B 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 IL12B. Ye et al. (2009) avaliaram, por meio de ELISA, a produção de IL12B 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 IL12B 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 IL12B, mas não em resposta ao LPS, como verificado neste estudo.

Novos experimentos vêm sendo realizados por esta equipe com o objetivo de determinar o efeito de tratamentos distintos sobre a produção de IL12B, em culturas de endométrios caninos *ex vivo*, visto que essa citocina não é avaliada por pesquisadores da área. Assim, em estudos posteriores será possível fazer a comparação dos dados internos e sugerir de maneira mais consistente as possíveis correlações entre as características das amostras, os tratamentos *in vitro*, o desafio com LPS e a dosagem de IL12B.

No presente estudo, o tratamento dos explantes endometriais de cadelas com dexametasona não provocou redução significativa da produção de IL6 e IL12B 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 a 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 (5ng/mL) utilizada no presente estudo, um dado interessante que pode refletir a diferença do efeito desse glicocorticoide na resposta imune dependendo do tempo de exposição.

Em humanos, a ação supressiva da dexametasona 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 IL12B em cadelas não foram encontrados, porém, estudo realizado por Agarwal et al. (1998) avaliou a produção de IL12B no sobrenadante de culturas de células mononucleares de sangue periférico humano 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 IL12B e aumento na 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 IL12B no sobrenadante de culturas de células dendríticas de ratos. Foi observado que as concentrações de IL12B foram significativamente menores nos grupos tratados com dexametasona, comparado ao grupo controle.

Entretanto, o presente estudo não encontrou evidências significativas da ação da dexametasona na concentração 5ng/mL sobre a produção de IL6 e IL12B 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.

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 IL12B 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 neste estudo 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 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 desordens reprodutivas. 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.

6. CONCLUSÃO

A presença de infiltrado inflamatório no endométrio de cadelas clinicamente saudáveis é frequente. A inflamação exerce efeito negativo sobre a produção das citocinas IL6 e IL12B em culturas de endométrios *ex vivo* desafiadas com LPS, indicando possível comprometimento da imunidade inata uterina pela presença prévia de um infiltrado inflamatório.

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.
- AOKI, T.; NARUMIYA, S. Prostaglandins and chronic inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 6, p. 304–311, 2012.
- 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.
- BÍBLIA Sagrada Nova Versão Internacional: antigo e novo testamento. **Provérbios 16**. 1 ed. São Paulo: Editora Vida, 2003. 1394 p.
- 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. 526-53/9, 2012.
- 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.
- 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.
- CONCANNON, P. W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 200–210, 2011.
- 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.
- DEL VECCHIO, M. et al. Interleukin-12: Biological properties and clinical application. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 16, p. 4677–4685, 2007.
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **CHEST**, v. 118, n. 2, p. 503–508, 2000.
- DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of Comparative Pathology**, v. 69, n. 1, p. 237–252, 1959.
- 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.
- 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. 107-108, 1992.
- FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. Cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex. In: **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**, 2. ed., Philadelphia: W.B. Saunders, p. 605-618, 1996.
- FONTAINE, E. et al. Diagnosis of endometritis in the bitch: A new approach. **Reprod Dom Anim**, v. 44, S 2, p. 196–199, 2009.
- 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.
- 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.
- GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2006.
- 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.
- GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. F. The immuno-inflammatory cascade. **British Journal of Anaesthesia**, v. 77, n. 1, p. 11–16, 1996.
- 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.
- GOLDSTON, R.T.; HOSKINS, J.D. **Geriatrics e gerontologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 1999. 551 p.
- 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.
- 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.
- 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.
- HAGMAN, R. Molecular aspects of uterine diseases in dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 3, p. 37–42, 2017.
- HAGMAN, R. Pyometra in Small Animals. **Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice**, v. 48, n. 4, p. 639–661, 2018.
- 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.

JURSA, 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, n. 1, p. 1–12, 2014.

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.

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.

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.

MONTEIRO, C. M. R. et al. Histologia e morfometria em cornos uterinos de cadelas nulíparas, múltíparas e tratadas com contraceptivos 1. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 10, p. 847–851, 2009.

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

PAHWA, R.; JIALAL, I. Chronic inflammation. **StatPearls**, 2018.

PRAPAIWAN, N. et al. Expression of oxytocin, progesterone, and estrogen receptors in the reproductive tract of bitches with pyometra. **Theriogenology**, v. 89, n.1, p. 131–139, 2017.

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.

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.

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.

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.

SCHLAFER, D. H. Diseases of the canine uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, S6, p. 318–322, 2012.

SCHLAFER, D. H.; GIFFORD, A. T. Cystic endometrial hyperplasia, pseudo-placentational endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 349–358, 2008.

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.

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.

SILVA, E. et al. Oestrous cycle-related changes in production of toll-like receptors and prostaglandins in the canine endometrium. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 96, n. 1–2, p. 45–57, 2012.

SILVEIRA, C.P. et al. Estudo retrospectivo de ovariosalpingo-histerectomia em cadelas e gatas atendidas em Hospital Veterinário Escola no período de um ano. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, p.335-340, 2013.

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

SMITH, F. O. Canine pyometra. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 610–612, 2006.

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.

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

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 335–376, 2003.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014, p. 21-25.

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.

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.

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.

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.

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.