



## Influência do complexo hiperplasia endometrial cística – piometra na sensibilidade periférica à insulina e predisposição à diabetes mellitus: resultados preliminares

Endometrial cystic hiperplasia – pyometra complex influences in periferic insulin sensibility and diabetes mellitus predisposition: preliminary results

Álan Gomes Pöppel<sup>1</sup>, Fernando Espinosa Souza<sup>2</sup>, Karine da Silva Neves<sup>2</sup>, Carlos Afonso de Castro Beck<sup>3</sup>, Juliano de Souza Leal<sup>4</sup>, David Driemeier<sup>5</sup>, Camila Serina Lasta<sup>6</sup>, Félix Hilário Díaz González<sup>5</sup>, Sandra Costa Valle<sup>7</sup>, Luiz Carlos Kucharski<sup>8</sup> & Roselis Silveira Martins da Silva<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada-ICBS/UFRGS. <sup>2</sup>Graduação, FAVET/UFRGS (Bolsista CNPq). <sup>3</sup>Departamento de Medicina Animal, FAVET/UFRGS. <sup>4</sup>Mestrando em Patologia Veterinária, Setor de Patologia Veterinária, FAVET/UFRGS. <sup>5</sup>Departamento de Patologia Animal, FAVET/UFRGS. <sup>6</sup>Residente (R2) em Patologia Clínica, Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, HCV/UFRGS. <sup>7</sup>Nutricionista, Doutoranda, Ciências Fisiológicas, Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada. <sup>8</sup>Biólogo (a), Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS, Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada.

### ABSTRACT

Cystic endometrial hyperplasia – pyometra (HEC-P) represents an hormone-mediated condition with a strong inflammatory and septic component. Many reports point to positive relationship among inflammatory status, sepsis and insulin resistance. Glucose tolerance, lipidic profile, hormone-receptor binding profile and others aspects were compared between anestral bitches and bitches with HEC-P.

**Key words:** bitches, pyometra, glucose tolerance, insulin receptor.

### INTRODUÇÃO

A imunoendocrinologia evidenciou uma série de correlações entre o processo inflamatório e os efeitos da insulina [1,3,4]. A IL-1 reduz a ligação e a fusão de grânulos secretores de insulina em células  $\beta$  pancreáticas, com decréscimo preferencial da primeira fase de exocitose; característica da fase pré-diabética no *Diabetes mellitus* (DM) tipo I [7]. Também foi demonstrado o papel da IL-1 na morte celular de células  $\beta$  pancreáticas [10]. Com relação aos eventos pós-receptor, ocorre inibição da fosforilação do IRS-1 e associação com o fosfatidilinositol 3-quinase em resposta a IL-1a. [4].

Os mediadores da resposta inflamatória (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) iniciam mudanças metabólicas (hiperlipidemia e ativação da gliconeogênese) no organismo para prover nutrientes para o sistema imune [3]. No sistema nervoso central a IL-1 reduz o ponto de ajuste da glicemia, favorecendo a captação de glicose pelas células imunes durante a resposta inflamatória [1]. A piometra é uma condição inflamatória e infecciosa hormônio-mediada, limitante a vida em alguns casos, quando não tratada [8]. A exposição crônica e prolongada à progesterona em cadelas intactas é um fator de risco ao desenvolvimento do complexo hiperplasia endometrial cística-piometra (HEC-P) [2]. As elevadas concentrações de progesterona e de GH mamário durante o diestro são importantes fatores envolvidos na maior predisposição ao desenvolvimento de diabetes mellitus em cadelas em diestro [4]. O GH mamário pode causar alterações hiperplásicas no endométrio [4]. O objetivo deste trabalho é avaliar a sensibilidade à insulina em cadelas com hiperplasia endometrial cística – piometra.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Onze cadelas em anestro (idade média 1,51 anos  $\pm$  1,02) encaminhadas para ovário-salpingo-histerectomia (OSH) eletiva, e 15 cadelas (idade média 6,83  $\pm$  2,78) encaminhadas para OSH como parte do tratamento para HEC-P no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS; foram selecionadas respeitando critérios de inclusão e exclusão.

De cada paciente foram avaliados: a citologia vaginal, o hemograma; e concentrações plasmáticas de fibrinogênio, de triglicérides e de colesterol (kits diagnósticos<sup>1</sup>). No pré-operatório, foi realizado um teste intra-venoso de tolerância à glicose (IVGTT) com determinação de glicemia nos tempos 0, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 minutos de IVGTT [6]. Para determinação da glicemia foi utilizado um glucometro portátil<sup>2</sup>. O protocolo anestésico foi padronizado, para ambos os grupos, com ampicilina sódica (22 mg/kg, IV), meperidina (3 mg/kg, IM), propofol (5 mg/kg, IV) e manutenção com isoflurano em oxigênio à 100%. Após OSH coletou-se 2 gramas de músculo reto-abdominal de cada paciente; imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos permaneceram congelados a -80°C até posterior estudo de ligação hormônio-receptor. Amostras do útero foram armazenadas em formol a 10% para análise histopatológica.

As membranas de músculo foram preparadas homogeneizando o músculo em tampão TES (Tris 10mM, EDTA 1mM, Sacarose 250mM) pH 7,4 (1:5 P/V) e isoladas por centrifugação fracionada sob refrigeração. Os ensaios de ligação foram realizados oferecendo-se 400  $\mu$ g de proteína por tubo em tampão Krebs-Ringer mamífero (KRM) pH 7,4 com albumina sérica bovina (BSA) a 1% na presença de concentrações crescentes de insulina regular humana<sup>3</sup> (0,1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml,

100 µg/ml, 250 µg/ml e 500 µg/ml) mais 20000 cpm de insulina-I<sup>125</sup> humana<sup>4</sup> ou somente na presença de insulina marcada (ligação total). Após 2 horas de incubação a 25°C, o conteúdo dos tubos foi filtrado (filtro Whatman<sup>5</sup>). Cada filtro foi lavado 5 vezes com 1 ml de KRM 0,1% BSA. Depois de secos foi medida, em contador LKB, a formação do complexo insulina-I<sup>125</sup> humana/receptor. O tratamento estatístico foi feito com ANOVA de uma via seguida de Teste de Tukey, considerou-se significativo valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

O peso médio do grupo anestro (An) foi 14,3 kg  $\pm$  6,5 (condição corporal 2,92  $\pm$  0,47), enquanto o grupo HEC-P teve peso médio de 27,1 kg  $\pm$  11,5 (condição corporal 2,88  $\pm$  0,56). Observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos leucócitos totais (An 10,3  $\times 10^3$  milhões/mm<sup>3</sup>  $\pm$  2,6; HEC-P 29,7  $\times 10^3$  milhões/mm<sup>3</sup>  $\pm$  20,7) e no fibrinogênio plasmático (An 2,36 g/L  $\pm$  0,8; HEC-P 3,6 g/L  $\pm$  1,7). Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos triglicerídeos séricos (An 66,4 mg/dL  $\pm$  23,2; HEC-P 105,8 mg/dL  $\pm$  45,3) e no colesterol total sérico (An 140,7 mg/dL  $\pm$  23,4; HEC-P 181,2 mg/dL  $\pm$  92,9). A glicemia basal não variou ( $p > 0,05$ ) entre os grupos anestro (89,1 mg/dL  $\pm$  10,9) e HEC-P (83,4 mg/dL  $\pm$  10,8) nem nos tempos 3 (An 270,1 mg/dL  $\pm$  64,9; HEC-P 264,5 mg/dL  $\pm$  70,8), 5 (An 235,8 mg/dL  $\pm$  39,3; HEC-P 245 mg/dL  $\pm$  51,7), 7 (An 206 mg/dL  $\pm$  35; HEC-P 209,5 mg/dL  $\pm$  56,1) e 15 minutos (An 165,8 mg/dL  $\pm$  32,1; HEC-P 195,1 mg/dL  $\pm$  50,7). Contudo, nos tempos 30 (An 104,8 mg/dL  $\pm$  29; HEC-P 159,3 mg/dL  $\pm$  54,1), 45 (An 86,8 mg/dL  $\pm$  14,1; HEC-P 129,9 mg/dL  $\pm$  44,6) e 60 minutos de IVGTT (An 91,5 mg/dL  $\pm$  12; HEC-P 122,4 mg/dL  $\pm$  38,3), observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na glicemia do grupo HEC-P em comparação ao grupo anestro.

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a ligação total em ambos grupos (An 1372 cpm  $\pm$  500; HEC-P 1177 cpm  $\pm$  250). A redução percentual a partir da ligação total (100%) em presença de concentrações crescentes de insulina regular humana no grupo anestro foi de 70% (0,1 µg/ml); 70% (1 µg/ml); 59% (10 µg/ml); 56% (100 µg/ml); 48% (250 µg/ml) e 49% (500 µg/ml). No grupo HEC-P a redução percentual a partir da ligação total foi 94% (0,1 µg/ml); 74% (1 µg/ml); 68% (10 µg/ml); 61% (100 µg/ml); 51% (250 µg/ml) e 54% (500 µg/ml). O percentual de redução observado da ligação total na presença de 0,1 µg/ml de insulina regular humana foi significativamente diferente ( $p < 0,001$ ) entre os grupos.

## DISCUSSÃO

Os valores elevados de leucometria total e de fibrinogênio evidenciam o estado inflamatório do grupo HEC-P, o que pode estar relacionado à intolerância à glicose detectada no presente estudo [2,4,7,10]. A determinação futura da insulinemia e avaliação funcional dos receptores de insulina no presente estudo, permitirão averiguar a presença e característica da resistência insulínica. A avaliação histopatológica das amostras uterinas do grupo HEC-P permitirá a divisão em dois sub-grupos: hiperplasia endometrial cística isolada e piometra. Esta divisão poderá explicar as diferentes magnitudes de resposta inflamatória observadas no grupo HEC-P (leucócitos totais entre 18  $\times 10^3$  milhões/mm<sup>3</sup> e 96  $\times 10^3$  milhões/mm<sup>3</sup>). Algumas pacientes com HEC-P em excelente condição pré-operatória e com valores de leucócitos totais pouco elevados; apresentaram respostas ao IVGTT idênticas a respostas de cadelas controle. A avaliação histopatológica de úteros de algumas destas pacientes evidenciou a presença isolada de hiperplasia endometrial cística. Apesar de piometras graves não apresentarem valores de colesterol e triglicerídeos significativamente diferentes daqueles do grupo controle; os maiores valores (406 mg/dL) foram observados em pacientes com piometras graves [3]. Da mesma forma, observou-se correlação positiva entre grau de risco anestésico e maior magnitude de intolerância à glicose no IVGTT [3,4,7]. Entretanto, algumas pacientes com piometra grave apresentaram elevação de pequena magnitude na glicemia (156 mg/dL) durante a fase inicial do IVGTT. O desvio de glicose para o sistema imunológico pode explicar estes resultados em alguns casos [1].

A menor inibição da ligação total em presença de insulina regular na concentração de 0,1 µg/ml observada no grupo HEC-P pode evidenciar um perfil diferente de ligação entre a insulina e seus receptores de alta e baixa afinidade em membranas musculares. A análise destes dados com o programa de Scatchard permitirá a determinação da concentração dos receptores de insulina por µg de proteína de membrana bem como a determinação da constante de dissociação hormônio-receptor [10]. A análise posterior da atividade tirosina-quinase do receptor de insulina permitirá a avaliação da repercussão de um evento inflamatório/infeccioso no primeiro passo intra-celular na cascata de sinalização da insulina [4]. A importância de eventos relacionados ao receptor de insulina ou eventos pós-receptor no desenvolvimento da *Diabetes mellitus* canina ainda são pouco conhecidos [2]. A intolerância à glicose apresentada pelas pacientes com HEC-P pode ser o evento desencadeante do estado diabético nessas cadelas.

## CONCLUSÃO

O complexo HEC-P representa um fator de risco ao desenvolvimento de *Diabetes mellitus* em cadelas predispostas. Novos experimentos e análises permitirão esclarecer de forma mais clara os mecanismos envolvidos nesta interação imun-endócrina.

## NOTAS INFORMATIVAS

<sup>1</sup>Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil.

<sup>2</sup>Accu-Check Active, Roche Diagnóstica, Jacarepaguá, Brasil.

<sup>3</sup>3-[<sup>125</sup>I] iodotyrosyl A <sup>141</sup> insulin, human recombinant, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido.

<sup>4</sup>Biohulin R, Biobrás, Montes Claros, Brasil.

<sup>5</sup>GF/B, Whatman, Maidstone, Inglaterra.

## REFERÊNCIAS

- 1 **Del Rey A., Roggero E., Randolf A., Mahuad C., McCann S., Rettori V., Besedovsky H.O. 2006.** IL-1 resets glucose homeostasis at central levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*.103: 16039–16044.
- 2 **Feldman E.C. & Nelson R.W. 2004.** *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3.ed. Missouri: Saunders, 1089p.
- 3 **Grimble R.F. 2002.** Inflammatory status and insulin resistance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 5: 551-559.
- 4 **He J., Usui I., Ishizuka K., Kanatani Y., Hiratani K., Iwata M., Bukhari A., Haruta T., Sasaoka T., Kobayashi M. 2006.** Interleukin-1 $\beta$  inhibits insulin signaling with phosphorylating insulin receptor substrate-1 on serine residues in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology*. 20:114-124.
- 5 **Kooistra H.S., den Hertog E., Okkens A.C., Mol J.A., Rijnberk A. 2000.** Pulsatile secretion pattern of growth hormone during the luteal phase and mid-anoestrus in beagle bitches. *Journal of Reproduction and Fertility*. 119: 217–222.
- 6 **Mattheeuws D., Rottiers M.D., Kaneko J.J. & Vermeulen M.D. 1984.** Diabetes mellitus in dogs: relationship of obesity to glucose tolerance and insulin response. *American Journal of Veterinary Research*. 45: 98-103.
- 7 **Ohara-Imaizumi M., Cardozo A.K., Kikuta T., Eizirik D.L., Nagamatsu S. 2004.** The Cytokine Interleukin-1 $\alpha$  reduces the docking and fusion of insulin granules in pancreatic  $\beta$ -cells, preferentially decreasing the first phase of exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 41271–41274.
- 8 **Scatchard G. 1949.**The attraction of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 51: 660-677.
- 9 **Smith F.O. 2006.** Canine pyometra. *Theriogenology*. 66: 610–612.
- 10 **Steer S.A., Scarim A.L., Chambers K.T., Corbett J.A. 2005.** Interleukin-1 stimulates b-cell necrosis and release of the immunological adjuvant hmgb1. *PLoS Medicine*. 3:253-266.

