



VIA INFLAMATÓRIA DA COLINERGICA EM LINFÓCITOS DE BOVINOS COM ENDOMETRITE CLÍNICA, SUBCLÍNICA

HASAN, Jamile A.¹; SIQUEIRA, Lucas²; FERREIRA, Eduarda P.T.³; MORAES, Bibiana T.³; PEDROZO, Jayne R.³; GODINHO, Pietro A.³; PINTO, Pablo A.⁴; TOLAZZI, Cristian⁴; WOLKMER, Patricia²

Palavras-Chave: Afecções uterinas. Acetilcolina. Resposta inflamatória.

INTRODUÇÃO

A endometrite bovina é uma afecção comum que acomete principalmente vacas de leite no período pós-parto, comprometendo o desempenho reprodutivo causando uma queda na fertilidade subsequente dos animais (MADOZ *et al.*, 2014). O diagnóstico pode ser feito apenas com base na palpação retal (útero espessado, quando gravemente comprometido) e vaginoscopia (presença de secreções alteradas e congestão das mucosas). O “cytobrush” endometrial e a lavagem uterina são as técnicas recomendadas para o diagnóstico de endometrite citológica (AGARWAL *et al.*, 2013).

A compreensão das vias infamatórias e anti-inflamatórias da endometrite podem colaborar na compreensão da patogenia, além da possibilidade de desenvolvimento de tratamentos capazes de melhorar a resposta imune, reduzindo os casos de endometrites. Sabe-se que no trato genital, a defesa inicial do endométrio contra microorganismos é dependente de sistemas imunológicos inatos, incluindo receptores Toll-like (TLRs), peptídeos antimicrobiano e proteínas de fase aguda (WALKER *et al.*, 2014, SHELDON 2014). Uma vez que o sistema imune inato é ativado, citocinas e quimiocinas começam a dirigir a resposta inflamatória, que, no caso de endometrite é particularmente associada com o influxo de neutrófilos. Várias evidências sugerem a existência de uma relação entre os sistemas neuroendócrino e imune. Estudos indicam que estes dois sistemas apresentam um grau de

¹ Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), bolsista FAPERGS/2017. Email: jamylehasan@hotmail.com

² Docentes do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ). Email: pwolkmer@unicruz.com.br

³ Discentes do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ).

⁴ Egressos do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ).



interdependência e os linfócitos tem demonstrado a expressão de vários neurotransmissores, incluindo receptores adrenérgicos, dopaminérgicos e colinérgicos (TAYEBATI *et al.*, 2002).

Os linfócitos têm um papel importante na defesa do corpo. Sintetizam acetilcolina, que é degradada pela acetilcolinesterase (AChE), sendo denominado o sistema linfóide colinérgico levando a regulação de reações inflamatórias através da ativação dos receptores colinérgicos $\alpha 7$ nicotínico em macrófagos. A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima envolvida na hidrólise da acetilcolina em colina e acetato, assim, regulando a sinalização realizada pela ACh. Esta modulação ocorre via receptores muscarínicos e nicotínicos dos linfócitos e que os linfócitos possuem todos os componentes necessários para a constituição de um sistema colinérgico não-neuronal próprio (KAWASHIMA; FUJII, 2003;). Estas células possuem papel central no controle da imunidade, alterações na atividade da enzima que degrada a ACh no linfócito, a acetilcolinesterase (AChE), pode servir como subsídio na compreensão das vias inflamatórias da endometrite clínica e subclínica em bovinos.

O objetivo geral desse projeto é avaliar as vias inflamatórias colinérgicas em linfócitos de bovinos com endometrite clínica, subclínica e comparar estes resultados com animais saudáveis para que estes sirvam de subsídios para a compreensão das vias inflamatórias e estudo da patogenia da doença.

METODOLOGIA

A coleta das amostras foi realizada em uma fazenda de criação de vacas leiteiras da raça holandesa localizada no município de Boa Vista do Cadeado – RS, a qual possui 300 animais em lactação. Destas, inicialmente foram selecionadas 25 animais com 25-45 dias pós-parto. A coleta foi realizada 21 dias pós-parto, pois neste período ocorre resposta inflamatória normal de involução uterina. Baseados em exames clínicos e laboratoriais, estes animais foram divididos em 3 grupos, sendo: 10 vacas apresentando endometrite clínica, 5 endometrite sub-clínica e 10 sadias. A classificação dos animais foi baseada na técnica de diagnóstico de inflamações uterinas, que associa técnica citológica endometrial, vaginoscopia e ultrassonografia. Sendo que, a endometrite clínica o animal apresenta corrimento mucopurulento, endométrio espessado e presença de líquido uterino. Já a endometrite subclínica é aquela com uma quantidade maior que 5% de neutrófilos nas amostras citológicas, sem apresentação clínica. Os animais selecionados para o estudo foram



submetidos à coleta de sangue (10 ml) via veia jugular, armazenado em tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 10%.

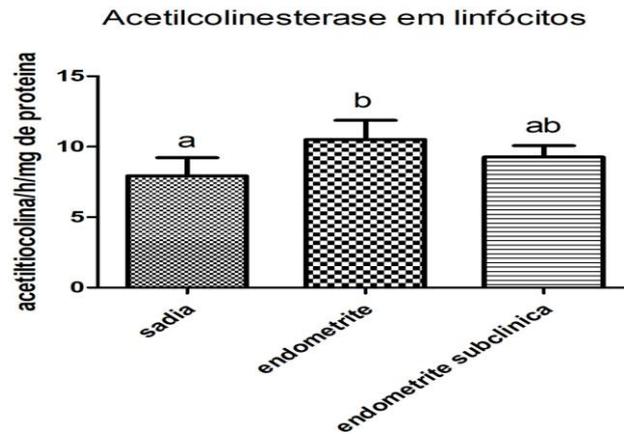
Para avaliar a Atividade da AChE nos linfócitos eles foram isolados do sangue coletado com EDTA por um gradiente de densidade Ficoll-Histopaque, técnica de centrifugação em gradiente de densidade para separar linfócitos de outras células sanguíneas, segundo método de Böyum (1968). A atividade da AChE em linfócitos foi determinada de acordo com o método descrito por Ellman *et al.* (1961) modificado por Fitzgerald e Costa (1993). Resumidamente, as proteínas de todas as amostras foram ajustadas para 0,1-0,2 mg / mL. 0,2ml de células intactas, adicionados a uma solução contendo 1,0 mM de acetiltiocolina (ATC), 5'5mM-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) 0,1 (DTNB), e tampão de fosfato 0,1 M (pH 8,0). Antes e após incubação durante 30 min a 27 ° C a absorvância foi lida em espectrofotômetro a 412 nm. A atividade da AChE é calculada a partir do quociente entre a atividade dos linfócitos e teor de proteína. Os resultados são expressos em μMol e AcSCh/h/mg de proteína..

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A atividade AChE nos linfócitos aumentou significativamente nos animais com endometrite, e ocorreu uma tendência ao aumento no grupo de endometrite subclínica ($P=0,6$) (Figura 1). Estes resultados demonstram a sensibilidade da atividade enzimática nos linfócitos como um marcador de baixa intensidade de inflamação sistêmica. Quando há um aumento na atividade AChE, ocorre uma rápida degradação de ACh que é considerada uma proteína com ação anti-inflamatória. A sua degradação rápida nos receptores nicotínicos em superfícies de linfócitos desencadeia proliferação de citocinas, serotonina, histamina, óxido nítrico, enzimas lisossômicas, prostaglandinas e leucotrienos que estão entre os mediadores do processo inflamatório (KAWASHIMA; FUJII, 2003;).



Figura 1) Atividade da acetilcolinesterase em linfócitos de bovinos da raça Holandesa apresentando endometrite clínica e subclínica, avaliadas entre 25-45 dias pós parto ($P < 0.05$, Tukey's).



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo mostram alterações em AChE de linfócitos de vacas com endometrite, indicando que o sistema colinérgico é alterado na patologia uterina. Estamos realizando mais estudos para compreender as vias colinérgicas inflamatória em bovinos com endometrite.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R. G. *et al.* Diagnosis and treatment of bovine endometritis--a review. *Intas Polivet*, v.14, n. 1, p. 25-31, 2013.
- BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, Oslo, v. 21, p. 77-89, 1968.
- ELLMAN, G.C. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v.21, n.19, p.88-95, 1961.
- KAWASHIMA, K; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life sciences*, v. 74, n. 6, p. 675-696, 2003.
- MADOZ, L. V. *et al.* Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 97, n. 1, p. 195-201, 2014.
- SHELDON, I. Martin *et al.* Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. *Reproduction*, v. 148, n. 3, p. R41-R51, 2014.



WALKER, C. Modulation of the immune system during post-partum uterine infection. In: 2014 ADSAASAS-CSAS Joint Annual Meeting. Asas, 2014.

TAYEBATI, S. K. *et al.* Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *Journal of neuroimmunology*, v. 132, n. 1, p. 147-155, 2002.