

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO CONTEÚDO  
ABOMASAL DE BOVINOS DE CORTE NA PRESENÇA  
OU AUSÊNCIA DE ÚLCERAÇÃO GÁSTRICA**

**FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI**  
Médico Veterinário

**Araçatuba-SP  
2016**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO CONTEÚDO  
ABOMASAL DE BOVINOS DE CORTE NA PRESENÇA  
OU AUSÊNCIA DE ÚLCERAÇÃO GÁSTRICA**

**Fernando Christiano Gabriel Morelli  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Adjunto Juliana Regina Peiró**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Doutorado em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica de Grandes Animais).

**Araçatuba-SP  
2016**

Catálogo na Publicação(CIP)  
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Morelli, Fernando Christiano Gabriel

M815q

Quantificação de citocinas no conteúdo abomasal de bovinos de corte na presença ou ausência de ulceração gástrica / Fernando Christiano Gabriel Morelli.

Araçatuba: [s.n], 2016.

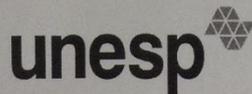
47f. il.; CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Medicina Veterinária, 2016

Orientadora: Prof. Adj. Juliana Regina Peiró

**1. Bovino. 2. Úlcera gástrica - albomaso. 3. Citometria de fluxo. 4. Célula Th1. 5. Célula Th2. I. T.**

CDD 636.2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

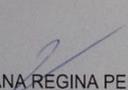
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Quantificação de citocinas no conteúdo abomasal de bovinos de corte na presença ou ausência de  
ulceração gástrica

**AUTOR: FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI**

**ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ**

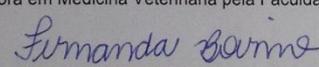
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL,  
área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ

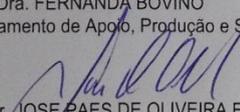
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

  
Dra. LINA MARIA WEHRLE GOMIDE

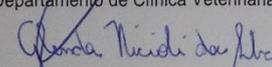
Doutora em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP

  
Profa. Dra. FERNANDA BOVINO

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

  
Prof. Dr. JOSE PAES DE OLIVEIRA FILHO

Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP

  
Profa. Dra. GLENDA NICIOLI DA SILVA

Escola de Farmácia / Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Araçatuba, 01 de fevereiro de 2016.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**FERNANDO CHRISTIANO GABRIEL MORELLI** – nascido em 01 de julho de 1963, em Guaraçai – SP, graduado em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – UNESP – em dezembro de 1985; Pós-graduado em Vigilância Sanitária e Epidemiológica pela UNAERP em 2000; Pós-graduado em Produção de Ruminantes pela Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina (FCAA) em 2009; Mestre em Ciência Animal, área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, em 2011; Professor de Clínica Médica de Grandes Animais no Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina desde agosto de 2008; Analista de Desenvolvimento Agrário na Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo “José Gomes da Silva”, Grupo Técnico de Campo de Andradina – SP, onde trabalha com Extensão Rural a produtores rurais familiares.

Gostaria de ter conseguido me dedicar às coisas que realizei com a mesma intensidade com que aprendi com elas.

“Eu tenho um sonho, uma fantasia que me ajuda a atravessar a realidade e o meu destino.  
Faz valer a pena, enquanto me empurra através da escuridão.

Eu acredito em anjos, algo bom em tudo o que vejo.”  
*(Benny Andersson & Björn Ulvaeus)*

Para  
VALDAIR E NAZIMA, meus pais, meus grandes exemplos.  
Pelo constante incentivo e apoio incondicional.  
É importante ter vocês sempre por perto.

Querida NELI

JOÃO AUGUSTO

FERNANDA A M

FERNANDA P M

Alguenzinho que vem vindo!

Meus maiores presentes, por toda a vida.

Agora teremos mais tempo.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por mais esta oportunidade.

À Prof<sup>a</sup> Adjunto Juliana R. Peiró, pela dedicação, seriedade e, acima de tudo, amizade. Você será sempre muito especial.

À Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina por ter me aberto as portas para esse novo caminho.

À Fundação ITESP, pelo apoio na obtenção de mais este título.

Ao Prof<sup>o</sup> Adjunto Luiz Cláudio Nogueira Mendes pela amizade.

À Prof<sup>a</sup> Silvia Helena Venturoli Perri pela realização da análise estatística e pela compreensão nas aulas de Estatística.

À Prof<sup>a</sup> Gisele Fabrino Machado e ao Lorinaldo Lopes de Moraes, funcionário do Serviço de Patologia Veterinária da FMVA-UNESP, pela realização dos exames histopatológicos.

Aos professores da Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina: muitos colegas, muitas possibilidades.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP pela convivência e conhecimentos transmitidos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, na pessoa de sua Coordenadora, a Profa. Adjunto Juliana R. Peiró, pela oportunidade de realizar esse curso.

Aos anjos da guarda desta jornada, Priscila Dalmagro e Leonardo Aparecido Teixeira Bentin, pela constante ajuda e estímulo. Sem vocês esse trabalho não teria sido possível.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Isabel Pereira de Matos, Fátima Maria Metello Bertolucci e Fernando Correa de Lacerda, pela ajuda nas dúvidas na hora das pesquisas bibliográficas.

Ao colega médico veterinário José Osmar Maximino Fernandes, Sr. Paulo Cesar Rinaldi, Sra. Meire Sato, Sra. Margarete Alves, Maria Elze Vieira dos

Santos e demais funcionários do abatedouro, pela colaboração na coleta do material para análise.

Aos colegas com quem compartilhei as disciplinas desse curso.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
I INTRODUÇÃO .....	15
II REVISÃO DE LITERATURA .....	18
III MATERIAL E MÉTODO .....	23
3.1 Colheita, classificação e análise das amostras teciduais .....	23
3.1.1 Tecidos para histopatologia .....	23
3.1.2 Exame histopatológico .....	24
3.1.3 Amostras do líquido abomasal .....	24
3.1.4 Determinação das concentrações de citocinas no líquido abomasal por citometria de fluxo <sup>2</sup> .....	25
3.2 Análise estatística .....	27
IV RESULTADOS .....	28
4.1 Macroscopia .....	28
4.2 Microscopia .....	30
4.3 Concentrações de citocinas .....	33
V DISCUSSÃO .....	38
VI CONCLUSÃO .....	41
VII REFERÊNCIAS .....	42
APÊNDICE .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

CD4 <sup>+</sup>	=	Linfócito cluster de diferenciação 4
G-CSF	=	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	=	Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos
HMGB1	=	Proteína do grupo de alta mobilidade 1
IFN- $\gamma$	=	Interferon- $\gamma$
IgE	=	Imunoglobulina E
IgG	=	Imunoglobulina G
IL-1 $\alpha$	=	Interleucina-1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	=	Interleucina-1 $\beta$
IL-2	=	Interleucina-2
IL-4	=	Interleucina-4
IL-6	=	Interleucina-6
IL-10	=	Interleucina-10
IL-12	=	Interleucina-12
IL-17A	=	Interleucina-17A
mAbs	=	Anticorpos monoclonais
MHC	=	Complexo principal de histocompatibilidade
NK	=	Células Natural Killer
Th1	=	Resposta inflamatória perfil Th1
Th2	=	Resposta inflamatória perfil Th2
TLR-2	=	Receptores "Toll-like" 2
TNF- $\alpha$	=	Fator de necrose tumoral- $\alpha$

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Líquido abomasal. [A] Não centrifugado. [B] Sobrenadante após primeira centrifugação. [C] Sobrenadante após segunda centrifugação. [D] Filtrado em microfiltro de 0,22  $\mu\text{m}^1$ . [E] Microfiltro de 0,22  $\mu\text{m}^1$ .....25
- FIGURA 2** – Distribuição das frequências de bovinos de abatedouro de acordo com a ausência (controle) ou presença de úlcera abomasal (grau 1 ou 2), o manejo nutricional e sexo do animal.....28
- FIGURA 3** - Classificação das úlceras da região cárdica do abomaso. [A] Abomaso normal – tecido íntegro sem presença de erosões. [B] Grau 1 – ulceração e erosão não perfuradas com mínima lesão na mucosa. [C] Grau 2 – ulceração e erosão não perfuradas combinadas com tecido de desvitalização e sangramento. Setas de cor branca indicam as úlceras. ....29
- FIGURA 4** - Corte histológico de tecido de região cárdica de abomaso normal. Observar a integridade de todas as estruturas (A=4x; B=10x). Coloração: HE.....30
- FIGURA 5** - Corte histológico de tecido da região cárdica de abomaso com úlceras de grau 1: (A) presença de lesão com tecido necrótico nas vilosidades (seta de cor branca) (10x); (B) presença de infiltrado inflamatório (seta de cor amarela) (40x). Coloração: HE. ....31

- FIGURA 6** - Corte histológico de tecido da região cárdica de abomaso com úlceras de grau 2: (A) presença de lesão com tecido necrótico na lâmina própria (seta de cor branca), edema na muscular da mucosa (4x); (B) presença de infiltrado inflamatório (seta de cor amarela) e hemorragia intersticial (seta de cor azul) (40x). Coloração: HE. ....32
- FIGURA 7** - Concentrações de citocinas (pg/mL) no líquido abomasal de bovinos controle (sem úlceras no abomaso) e com úlceras no abomaso de grau 1, grau 2.....34
- FIGURA 8** – Gráfico representativo obtido pela citometria de fluxo do líquido abomasal do grupo controle para cada citocina (IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2) demonstrando os deslocamentos dos “clusters” e os sete picos individuais respectivamente. ....35
- FIGURA 9** – Gráfico representativo obtido pela citometria de fluxo do líquido abomasal do grupo grau 1 para cada citocina (IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2) demonstrando os deslocamentos dos “clusters” e os sete picos individuais respectivamente. ....36
- FIGURA 10** – Gráfico representativo obtido pela citometria de fluxo do líquido abomasal do grupo grau 2 para cada citocina (IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2) demonstrando os deslocamentos dos “clusters” e os sete picos individuais respectivamente. ....37
- FIGURA 11** - (A-F) curvas padrões das citocinas onde o eixo X corresponde a concentração e o eixo Y corresponde à média de intensidade de fluorescência, com seus respectivos R<sup>2</sup>. Imagens obtidas do software FCAP array 3.0.....47

## QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO CONTEÚDO ABOMASAL DE BOVINOS DE CORTE NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE ÚLCERAÇÃO GÁSTRICA

**RESUMO** – Erosões e úlceras são achados comuns no abomaso e causam preocupação econômica nos mais variados sistemas de produção de gado. Muitos fatores podem predispor ao aparecimento de úlceras e acúmulo de gases no abomaso, incluindo alimentos grosseiros, estresse ambiental, deficiências de vitaminas e minerais e infecções bacterianas. Essas úlceras podem ser subclínicas, sendo descobertas nas necropsias ou após o abate do animal, ou levarem à redução da motilidade do órgão, prejudicando o fluxo do seu conteúdo e causando transtornos digestivos graves e até ao aparecimento de síndromes semelhantes à indigestão vagal. Existem informações a respeito da resposta do sistema imune na maior parte das mucosas do trato gastrintestinal de não-ruminantes e ruminantes, porém são raras a respeito do abomaso. Os objetivos desse estudo foram detectar os níveis de citocinas (IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2) no conteúdo abomasal em bovinos de corte, determinar o perfil Th1 ou Th2 dessas citocinas em animais com úlceras de grau 1 e 2 na região cárdica abomasal e comparar esses valores com os níveis de citocinas de animais sem úlceras (controle), em amostras colhidas em abatedouro, para auxiliar na compreensão da fisiopatologia do processo inflamatório local. A avaliação macroscópica e a classificação das úlceras foi realizada por meio de exames visual e histológico em amostras de tecidos da parede da região cárdica abomasal ulcerada. Os níveis de citocinas produzidas do líquido abomasal dos animais com ou sem úlceras foram avaliados por citometria de fluxo (método Cytometric Bead Array). As citocinas citadas foram detectadas no líquido do abomaso dos bovinos. Não houve diferença na liberação das citocinas entre os grupos com úlceras e o grupo sem úlcera, indicando um equilíbrio entre perfis Th1 e Th2 da resposta inflamatória.

**Palavras chave:** úlceras gástricas - abomaso; células Th1; células Th2; citometria de fluxo.

## **CYTOKINE LEVELS IN THE ABOMASAL FLUID IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF GASTRIC ULCERS IN BEEF CATTLE**

**ABSTRACT** – Erosions and ulcers are common findings in the abomasum and cause economic concern in several livestock production systems. Many factors may predispose to ulcers and bloat in the abomasum, including roughage, environmental stress, deficiencies of vitamins and minerals and bacterial infections. These ulcers may be subclinical and are found during necropsy or after slaughter, or lead to reduction of abomasal motility, hindering the flow of your content and causing serious digestive disorders and even the appearance of syndromes similar to vagal indigestion. There are some studies evaluating the immune system response in most of the mucous membranes of the gastrointestinal tract of non-ruminants and ruminants, but rarely related to the abomasum. The aims of this study were to investigate the levels of cytokines (IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2) in the abomasal fluid of beef cattle, to determine the Th1 or Th2 profile of these cytokines in animals with types 1 or 2 ulcers located in the abomasal cardiac region and to compare these levels with those of animals without ulcers (controls), in samples collected in an abattoir, to help to the understand the pathophysiology of the local inflammatory process. Ulcers from the abomasal cardiac region were macroscopically evaluated, then classified by histology. Cytokine levels in the abomasal fluid from animals with or without ulcers were evaluated by flow cytometry (Cytometric Bead Array). Cytokines were detected in the abomasum fluid of cattle. There was no difference in the release of cytokines between groups, indicating a balance between Th1 and Th2 profiles of the inflammatory response.

**Keywords:** gastric ulcers - abomasal; Th1 cells; Th2 cells; flow cytometry.

## I INTRODUÇÃO

O manejo cada vez mais intensivo dos bovinos, na busca de aumentos de produtividade, leva ao aumento da frequência e variedade das doenças do sistema digestivo e dentre elas as do abomaso. Úlceras do abomaso são vistas em animais de todas idades e cruzamentos, mas são mais comuns em animais em manejo intensivo (TRENT, 2004).

As mucosas do trato gastrointestinal dos ruminantes e não ruminantes estão em constante contato com uma gama muito grande de microrganismos e são continuamente desafiadas por eles. O trato gastrointestinal tem o papel de absorção de nutrientes e é a primeira linha de defesa do organismo ao mesmo tempo. Lesões nessa mucosa levam a uma diminuição dessa capacidade de defesa (CURFS et al., 1997; DILDA et al., 2012; DOMMETT et al., 2005).

Úlceras e erosões são achados comuns no abomaso dos bovinos. Muitos fatores podem predispor ao aparecimento dessas lesões, dentre eles os alimentos grosseiros, estresse ambiental e de manejo, deficiências de vitaminas e minerais e infecções bacterianas (MARSHALL, 2009; MILLS et al., 1990; NIEHALS, 2008), além de dietas ricas em grãos, precipitação pluviométrica e adubação das pastagens, que vão determinar a qualidade da forrageira – maior ou menor quantidade de fibra, uso de anti-inflamatórios não esteroidais, leucose bovina a vírus e secundariamente aos deslocamentos de abomaso (RADOSTITS, 2002). Tumores na parede do abomaso também são descritos como causa de úlceras abomasais perfurantes e peritonite difusa (PALMER; WHITLOCK, 1983; SASAKI et al., 2012).

São lesões que causam preocupação econômica principalmente nos sistemas de criação de bezerros, mas aparecem nos animais submetidos a todos os sistemas de produção de gado de corte e leite, interferindo negativamente na performance dos animais (MARSHALL, 2009).

Muitos microrganismos têm sido isolados das úlceras de abomaso tais como *Escherichia coli*, *Sarcina* spp e *Clostridium perfringens*, porém não se tem ainda comprovada uma relação semelhante dessas bactérias como a que ocorre entre *Helicobacter pylori* e úlceras gástricas em humanos (HUND et al., 2015; MARSHALL, 2009; MILLS et al., 1990).

Essas lesões podem causar atonia ruminal, diminuição da produção de fezes, aumento da frequência cardíaca, cetonúria ou albuminúria, sem alteração da temperatura corpórea (DUKES, 1996). Nas úlceras não perfurantes os sinais clínicos podem ser anorexia parcial, diminuição da atividade ruminal, sangue oculto positivo no exame fecal. Além dos sinais clínicos anteriores, nas úlceras não perfurantes com hemorragias acentuadas observam-se anemia, mucosas pálidas, melena, taquicardia, extremidades frias. Havendo perfuração, pode haver peritonite local ou difusa, acompanhada de sinais clínicos que vão desde anorexia total, hipertermia, seguida de hipotermia, motilidade ruminal bastante comprometida, ou até ausente, dor abdominal, choque e decúbito terminal (GUARD, 2006).

A perfuração do abomaso causada pelas úlceras é tida como importante causa de morte súbita em ruminantes. Mesmo as úlceras não perfurantes são causas comuns de sangramentos, debilidade, anemia e até mesmo a morte (CASTEEL; TURK, 2006). Alguns autores citam as úlceras de abomaso subclínicas (não perfurantes, não hemorrágicas) como as de ocorrência mais comum, achadas em necropsias e animais abatidos em frigoríficos, ocorrendo secundárias a outras doenças (TULLENERS; HAMILTON, 1980), e que a morte devido a elas é incomum (WELCHMAN; BAUST, 1987, *apud* MUELLER et al., 1999).

O principal achado de necropsia é a lesão da parede do abomaso. Quando há necrose do abomaso há alterações no fluxo pilórico e do abomaso, o que leva a síndromes parecidas à indigestão vagal. Isso ocorre com frequência nas tentativas de correção cirúrgica de deslocamentos do abomaso (SATTLER et al., 2000), e tratamento medicamentoso raramente é utilizado sozinho na

correção dos deslocamentos de abomaso, sendo comumente associados à cirurgia (NIEHALS, 2008).

Há informações sobre a resposta do sistema imune na mucosa do aparelho gastrointestinal da maioria das espécies animais, ruminantes e não-ruminantes (DOMMETT et al., 2005; TREVISE, 2014). Entretanto, a respeito da resposta do sistema imune no conteúdo do abomaso não foram encontradas informações na literatura consultada.

## II REVISÃO DE LITERATURA

Úlceras de abomaso são lesões que penetram toda a espessura da mucosa, podendo se estender até a submucosa, muscular externa e serosa, podendo ser únicas ou múltiplas, variando de tamanho (MARSHAL, 2009; TARNAWSKI, 1993; TARNAWSKI, 2005). Podem ser definidas como um processo de autodigestão da mucosa pela ação dos ácidos gástricos, quando o equilíbrio entre processos protetores e destrutivos está alterado (MARSHAL, 2009; THARWAT; AHMED, 2012; TRENT, 2004). São atualmente classificadas em quatro tipos: 1) úlceras não perfurantes; 2) úlceras não perfurantes, com sangramento; 3) úlceras perfuradas com peritonite localizada; 4) úlceras perfuradas com peritonite difusa (MARSHALL, 2009; RADOSTITS, 2002; TRENT, 2004). Na análise histopatológica observa-se duas estruturas principais compondo a úlcera: uma margem formada por epitélio não necrótico nas bordas e, na base do tecido conjuntivo, tecido de granulação com presença de fibroblastos, macrófagos e neovascularização (TARNAWSKI, 1993; TARNAWSKI, 2005).

A isquemia da mucosa desencadeia o processo de necrose que dá origem às úlceras, havendo formação de radicais livres e restrição de fornecimento de nutrientes ao tecido. Isso acontece pela ocorrência de trombos, constrição de vasos e microvascularização (TARNAWSKI et al., 1995).

Há liberação de leucotrieno B pela necrose tecidual, atraindo leucócitos e macrófagos que vão fagocitar o tecido necrosado e liberar citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estas, por sua vez, vão promover ativação de fibroblastos locais, células endoteliais e epiteliais (CLARK, 1996, *apud* TARNAWSKI, 2005).

O processo de cicatrização das úlceras é complexo e envolve migração e proliferação celulares, reepitelização, angiogênese e deposição de matriz extracelular, levando à formação da cicatriz. Esse processo é controlado por

fatores de crescimento, fatores de transcrição e citocinas (COTRAN et al., 1999; TARNAWSKI, 1993; TARNAWSKI, 2005).

Em úlceras gástricas de ovinos, observou-se um moderado infiltrado inflamatório na lâmina própria com necrose coagulativa e infiltração de células inflamatórias na mucosa, nas reações inflamatórias agudas e nas crônicas, com reduzido número de glândulas tubulares (JASSIM, 2014).

Células epiteliais dos pré-estômagos do bovino podem reconhecer e responder a fermentações com potencial de causar problemas. O reconhecimento dessas situações e a resposta são modulados por receptores e moléculas sinalizadoras do sistema imune inato e a precisa caracterização das vias pelas quais ocorrem deve ser tema prioritário para a pesquisa animal, pois uma resposta inflamatória descontrolada pode trazer sérias ameaças à saúde do animal (TREVISE et al., 2014).

Em humanos, peptídeos antimicrobianos (defensinas, catelicidinas e lisozimas) produzidos na mucosa do trato gastrointestinal são importantes barreiras contra microrganismos, podendo atuar individualmente ou sinalizando para a atuação dos vários componentes do sistema imune inato ou adaptativo (DOMMETT et al., 2005).

Uma resposta imune local pode afetar tecidos linfoides em locais distantes no organismo (DURAMAD et al., 2005; TREVISE et al., 2009). Proteínas de fase aguda (Haptoglobina, Proteína Amilóide Sérica A, Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo e Glicoproteína Ácida 1 $\alpha$ ) foram detectadas nas mucosas dos pré-estômagos e abomaso de bovinos, indicando possível capacidade de geração de resposta local de fase aguda nos processos inflamatórios, contribuindo para a regulação da resposta imune inata contra bactérias e parasitas (DILDA et al., 2012).

Quando a barreira das mucosas é rompida, como na ocorrência das úlceras, o local torna-se fácil porta de entrada para microrganismos. Ao penetrarem a barreira das mucosas vão encontrar as defesas imunológicas do organismo que iniciarão uma reação inflamatória com importante participação de citocinas (CURFS et al., 1997).

Citocinas são produzidas e liberadas pelas células em resposta à presença de antígenos, microrganismos ou morte celular com necrose, sendo importantes no processo de cicatrização tecidual. São polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares e hidrossolúveis (ABBAS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; TARNAWSKI, 2005; TREVISE et al., 2014). Estas conduzem a resposta inflamatória aos locais das infecções ou lesões, promovendo condições para a cicatrização da ferida. Porém, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias pode gerar problemas hemodinâmicos ou distúrbios metabólicos sistêmicos. Interferem na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência das células imunológicas, além de regular a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (CURFS et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

As respostas inflamatórias com perfil Th1 (pró-inflamatórias) são caracterizadas pela presença de Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-6 (IL-6) e Interferon-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e as respostas com perfil Th2 (imunomoduladoras) pela presença de Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-10 (IL-10) (CURFS et al., 1997).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória, originando-se nos macrófagos, monócitos, células T que são frequentes no peritônio e baço, além de células “natural killer” (NK). Está presente em neurônios e células da glia. Ativa células endoteliais (promove inflamação, coagulação); ativa neutrófilos; no hipotálamo desencadeia febre; no fígado estimula a produção de proteínas de fase aguda; nos músculos promove o catabolismo de lipídeos, sendo um dos mediadores mais precoces e potentes da resposta inflamatória (ABBAS, 2009; LIN et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011).

A IL-2 é produzida principalmente pelas células T CD4<sup>+</sup>, atua na ativação, proliferação e diferenciação em células T efetoras e de memória; promove desenvolvimento, sobrevivência e função das células T reguladoras. Induz a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$ , promovendo ativação de neutrófilos, monócitos e proliferação e ativação de células NK (ABBAS, 2009; CURFS et al., 1997).

A IL-6 é pró-inflamatória, originada em macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos, células da glia, células endoteliais, células T. Atua no fígado, sendo um mediador precoce na síntese de proteínas da fase aguda nos processos dolorosos; nas células B, promove proliferação de células produtoras de anticorpos; IL-1 e TNF- $\alpha$  são seus indutores; causa febre; promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação/manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células NK. É considerada um importante marcador de lesão tecidual no período pós- cirúrgico (ABBAS, 2009; LIN et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011).

O IFN- $\gamma$  promove ativação clássica (funções microbidas aumentadas) em macrófagos; nas células B promove mudança de isotipo para subclasses IgG opsonizantes e fixadoras do complemento; nas células T promove diferenciação de Th1; em diversas células aumenta a expressão de moléculas MHC classe I e II, aumento do processamento de antígenos e da apresentação destes às células T; é a citocina detectada mais cedo no local da imunização com antígenos proteicos. Inibe respostas Th2 (ABBAS, 2009; CURFS et al., 1997).

A IL-17A é pró-inflamatória, produzida por células T-CD4 e outras; aumenta a produção de quimiocinas (IL-6 e IL-8) nas células endoteliais; nos macrófagos aumenta a produção de quimiocinas e citocinas, promovendo também o aumento de defensinas GM-CSF e G-CSF (ABBAS, 2009; CURFS et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

A IL-4 é liberada por mastócitos, eosinófilos, basófilos e células T CD4<sup>+</sup> (Th2); atua em células B, na mudança de isotipos para IgE; em células T na diferenciação de Th2; em macrófagos na ativação alternativa e inibição da ativação clássica mediada por IFN- $\gamma$ ; tem propriedades anti-inflamatórias; reduz os efeitos da IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 e inibe a produção de radicais livres de oxigênio (ABBAS, 2009; CURFS et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

A IL-10 origina-se nos macrófagos, células T (principalmente as reguladoras), tecido neuroendócrino e neural. Nos macrófagos e células dendríticas inibe a expressão de IL-12, de coestimuladores e de MHC classe II; é regulada por IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$  e por sua própria concentração. Tem efeito

supressivo sobre células Th1 (ABBAS, 2009; CURFS et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

Sabendo-se a importância das afecções do abomaso para a produtividade dos animais, os objetivos desse estudo foram detectar os níveis de citocinas (IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2) no conteúdo abomasal de bovinos de corte, determinar o perfil Th1 ou Th2 da resposta imune por meio da produção dessas citocinas em animais com úlceras de grau 1 e 2 na região cárdica abomasal e comparar esses valores com os níveis de citocinas de animais sem úlceras (controle), em amostras colhidas em abatedouro, para auxiliar na compreensão da fisiopatologia do processo inflamatório local.

### III MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Colheita, classificação e análise das amostras teciduais

Cento e cinquenta abomasos de bovinos abatidos para consumo humano foram examinados aleatoriamente na linha de produção em abatedouro frigorífico da região comercial de Araçatuba submetido ao Serviço de Inspeção Federal (SIF). Destes, foram selecionados 18 abomasos de bovinos machos (n=14) e fêmeas (n=4), da raça nelore e mestiços com predominância racial nelore, com idade entre 3,5 e 4 anos, alimentados a pasto e em confinamento (Figura 2). As informações sobre idade, sexo e manejo alimentar dos animais foram obtidas nos arquivos da empresa, após a colheita do material. Os abomasos foram separados das demais vísceras pelo funcionário do abatedouro e entregues aos pesquisadores. Foi realizada uma incisão longitudinal com tesoura de Metzenbaum curva de pontas rombas na curvatura maior dos abomasos e toda a superfície mucosa do órgão (regiões cárdica, fúndica e pilórica) foi examinada. As coletas foram realizadas nos meses de junho, julho e agosto de 2015.

##### 3.1.1 Tecidos para histopatologia

Os tecidos da região cárdica foram colhidos aleatoriamente dos abomasos obtidos na linha de produção e classificados macroscopicamente de acordo com as características das lesões. Do total de 150 abomasos avaliados, foram coletadas amostras de abomasos que se enquadraram na classificação inicialmente macroscópica, sendo confirmados por histopatologia conforme descrito por Hund et al. (2015). Ao final deste processo, 18 abomasos foram selecionados de acordo com as características macroscópicas de cada um dos 3 grupos, cuja classificação foi confirmada pela histopatologia em úlceras grau 1 (G1: erosões e úlceras não perfuradas com lesões mínimas na mucosa, n=6), úlceras grau 2 (G2: erosões e úlceras não perfuradas combinadas com mínima hemorragia na mucosa, n=6) e controle (C: sem lesões, n=6). Para o grupo

controle foram coletadas amostras de tecido da região cárdica de abomasos que não apresentaram nenhum tipo de lesão em qualquer região do órgão (cárdica, fúndica ou pilórica), enquanto para os demais grupos estas contiveram 50% de tecido saudável e 50% de tecido ulcerado.

### **3.1.2 Exame histopatológico**

As amostras de tecido (0,5 cm x 0,5 cm) foram colhidas da região do cárdia abomasal e acondicionadas em tubos contendo 1mL de formol a 10% tamponado. Todas as amostras foram incluídas em parafina, cortadas e coradas com hematoxilina e eosina. As amostras foram identificadas por números, não sendo conhecidos a identificação do animal e o grupo a que pertencia no momento da avaliação pelo patologista. À microscopia de luz, os elementos constituintes do tecido foram analisados quanto à integridade tecidual ou presença de alterações/lesões em vilosidades, lâmina própria, musculatura da mucosa e submucosa, para confirmação do tipo de lesão (úlceras grau 1 ou 2).

### **3.1.3 Amostras do líquido abomasal**

Líquido do conteúdo abomasal (10 mL) (Figura 1) foi colhido de cada abomaso (grupos C, G1 e G2) e mantido a 4°C até ser centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi centrifugado nas mesmas condições e filtrado em microfiltro<sup>1</sup>, alicotado e acondicionado em tubos tipo Eppendorff de 1,5 mL e armazenado em freezer a -80°C, para posterior quantificação das citocinas presentes no conteúdo abomasal por citometria de fluxo<sup>2</sup> (Cytometric Bead Array)<sup>3</sup>.

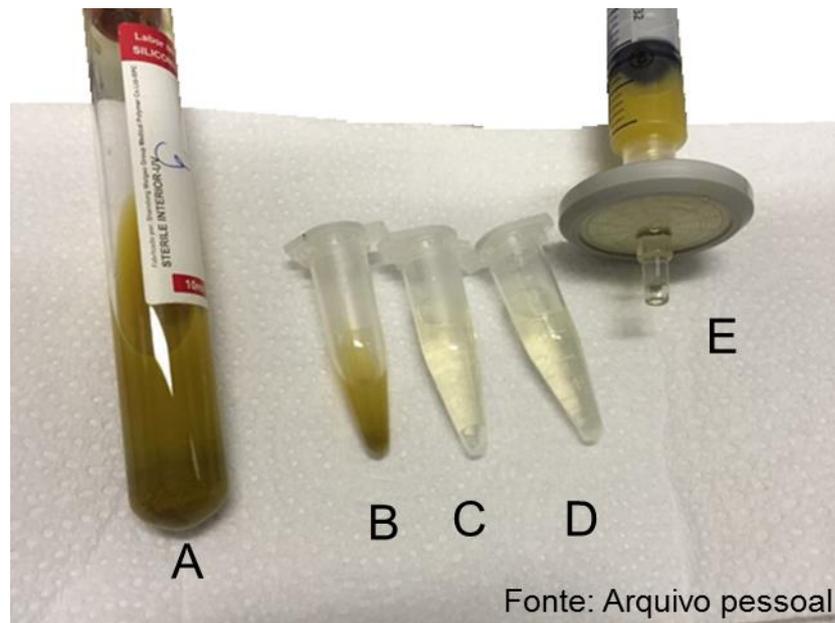
Para o grupo controle foi coletado líquido do conteúdo abomasal de órgãos que não apresentaram nenhum tipo de lesão em qualquer região (cárdica, fúndica e pilórica).

---

<sup>1</sup> TPP Spritzen/Syringe Filter-membrana 0,22µm – TTP Techno Plastic Products AG – Trasadingen - Switzerland

<sup>2</sup> Accuri C6, BD, San Jose, Califórnia, EUA.

<sup>3</sup> BD™ Cytometric Bead Array (CBA), San Diego, Califórnia, EUA.



**FIGURA 1** – Líquido abomasal. [A] Não centrifugado. [B] Sobrenadante após primeira centrifugação. [C] Sobrenadante após segunda centrifugação. [D] Filtrado em microfiltro de 0,22  $\mu\text{m}$ . [E] Microfiltro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.4 Determinação das concentrações de citocinas no líquido abomasal por citometria de fluxo<sup>2</sup>

As concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  (Th1); IL-4, IL-10 (Th2) e IL-17A foram mensuradas nas amostras de líquido abomasal de bovinos de corte pelo método Cytometric Bead Array<sup>3</sup> (CBA). Brevemente, alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  de líquido abomasal, alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  dos padrões de citocinas submetidas à diluição seriada com diluente (5.000 pg/mL, 1:2 – 2.500 pg/mL, 1:4 – 1.250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL) e 25  $\mu\text{L}$  de diluente apenas (controle negativo) foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL. Em seguida, em cada tubo foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  da mistura de esferas de captura conjugadas com anticorpos monoclonais anti-TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A e IFN- $\gamma$ , com subsequente incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem, centrifugadas a 600 x g por sete minutos a 18°C e o

sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram incubadas em 20 µL de uma solução de anticorpos monoclonais anticitocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) por 90 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 µL de tampão de lavagem, centrifugadas a 600 x g por sete minutos a 18°C e o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em 250 µL de reagente F e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo<sup>2</sup>. A aquisição dos dados (10.000 eventos) foi realizada a 488 nm. Desses, 2500 eventos foram utilizados na determinação da concentração de citocinas, que foi expressa em picogramas por mililitro (pg/mL)<sup>4</sup>.

Para justificar a utilização do kit humano, foi realizado um “blast”<sup>5</sup> (comparação de sequências de aminoácidos) onde observou-se grau de homologia entre as citocinas humanas e as da espécie bovina (*Bos taurus*): TNF 80% (187/234 aa), IL-2 65% (101/155 aa), IL-4 57% (87/153 aa), IL-6 53% (112/210 aa), IL-10 77% (137/177 aa) e IL-17A 75% (103/137 aa), IFN-γ 62% (102/165 aa). Valores semelhantes confirmando a reação cruzada dessas citocinas já foi demonstrada na literatura (PEDERSEN et al., 2002; DORNELES, 2015). Os números de acesso de cada citocina no “GenBank” utilizados para a realização do “blast”<sup>5</sup> foram: TNF humano CAA26669.1, TNF bovino DAA16338.1; IFN humano variante 1102214A, INF bovino ABX75548.1; IL-2 humana CAA25742.1, IL-2 bovina AAQ10670.1; IL-4 humana AAH70123, IL-4 bovina AAA 82730.1; IL-6 humana AAD13886.1, IL-6 bovina CAA40572.1; IL-10 humana AAI04254.1, IL-10 bovina AAA19011.1; IL-17A humana 4HR9.B, IL-17A bovina ACD81652.1.

---

<sup>4</sup> FCAP Array™ Software Version 3.0; **BD Biosciences** San Jose, CA 95131

<sup>5</sup> [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

### **3.2 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA)<sup>6</sup>. Os dados foram transformados em  $\log(x + 1)$  e avaliados comparando-se as médias das citocinas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis. Foram considerados significativos valores com  $p < 0,05$ .

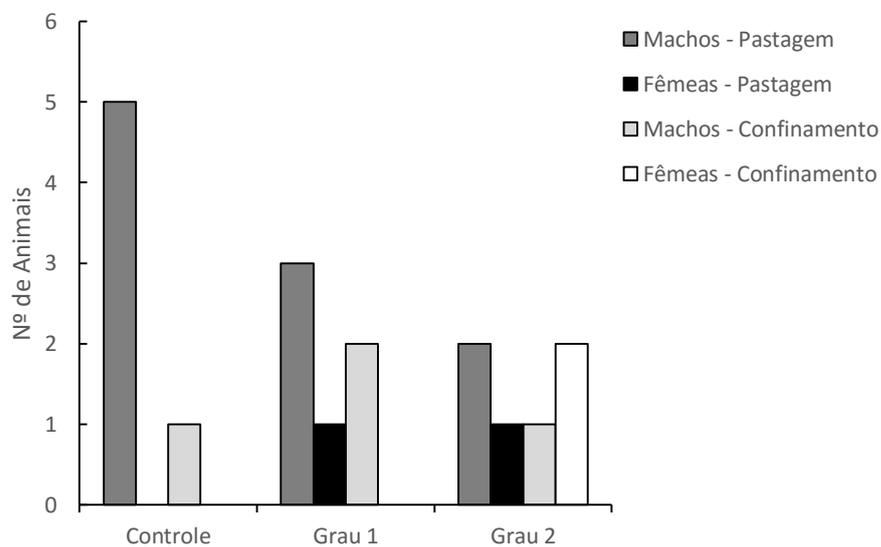
---

<sup>6</sup> SAS- SPSS STATISTIC versão 22.0, 2013, Cary, NC, EUA.

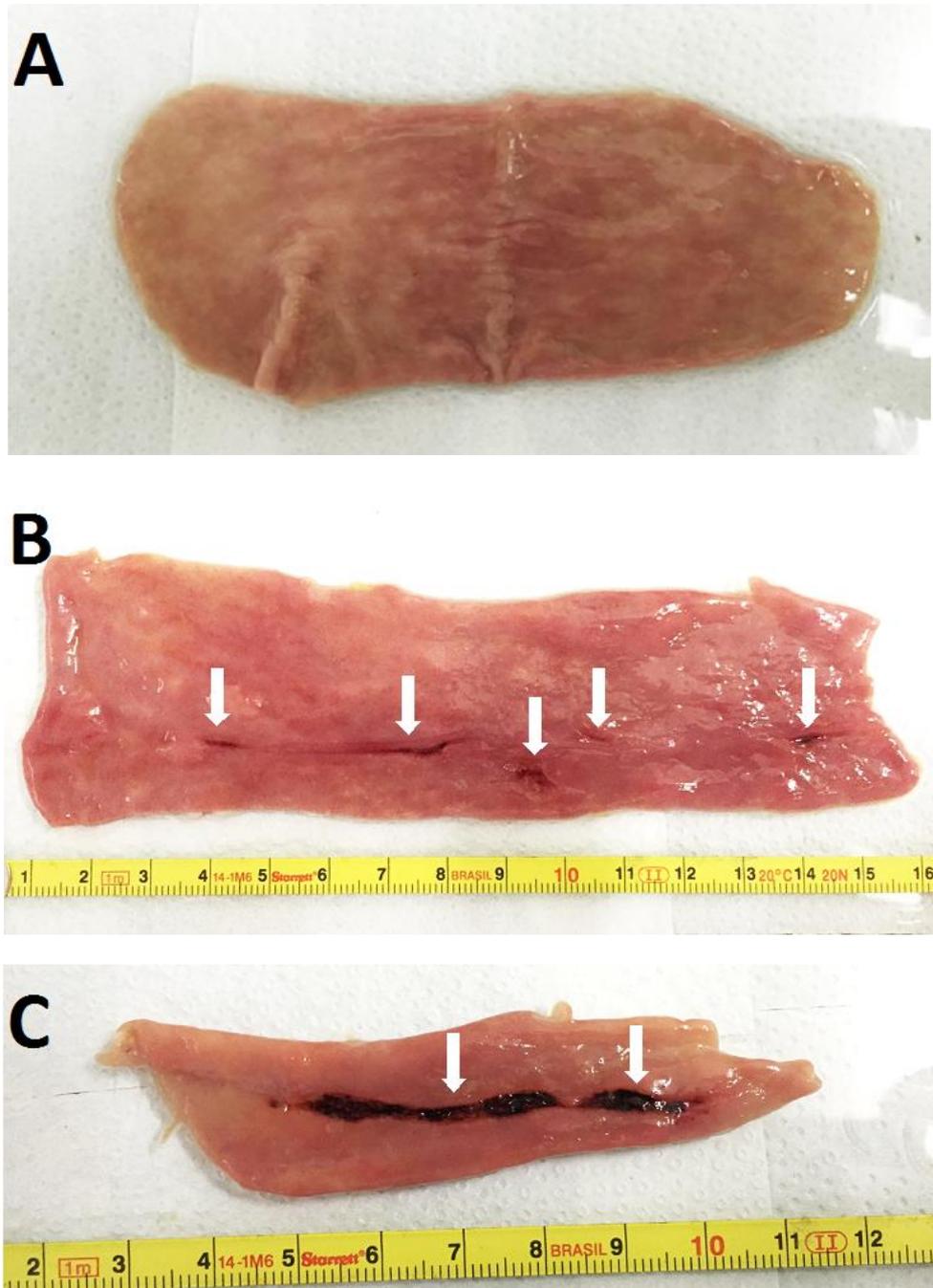
## IV RESULTADOS

### 4.1 Macroscopia

Os abomasos foram avaliados minuciosamente, inicialmente para verificar presença ou ausência de úlceras e depois para avaliar o tipo de úlcera (erosões superficiais ou erosões mais profundas, com sangramento e necrose tecidual) presentes na região cárdica do órgão (Figura 3). Após a confirmação pela análise histopatológica foram selecionadas amostras de 18 abomasos (Figura 2), sendo seis para cada condição (C: sem lesões; G1: lesões superficiais; G2: lesões mais profundas, com sangramento). Não foram encontrados abomasos com lesões perforantes completas da parede gástrica e por isso não foram incluídas no estudo úlceras graus 3 e 4.



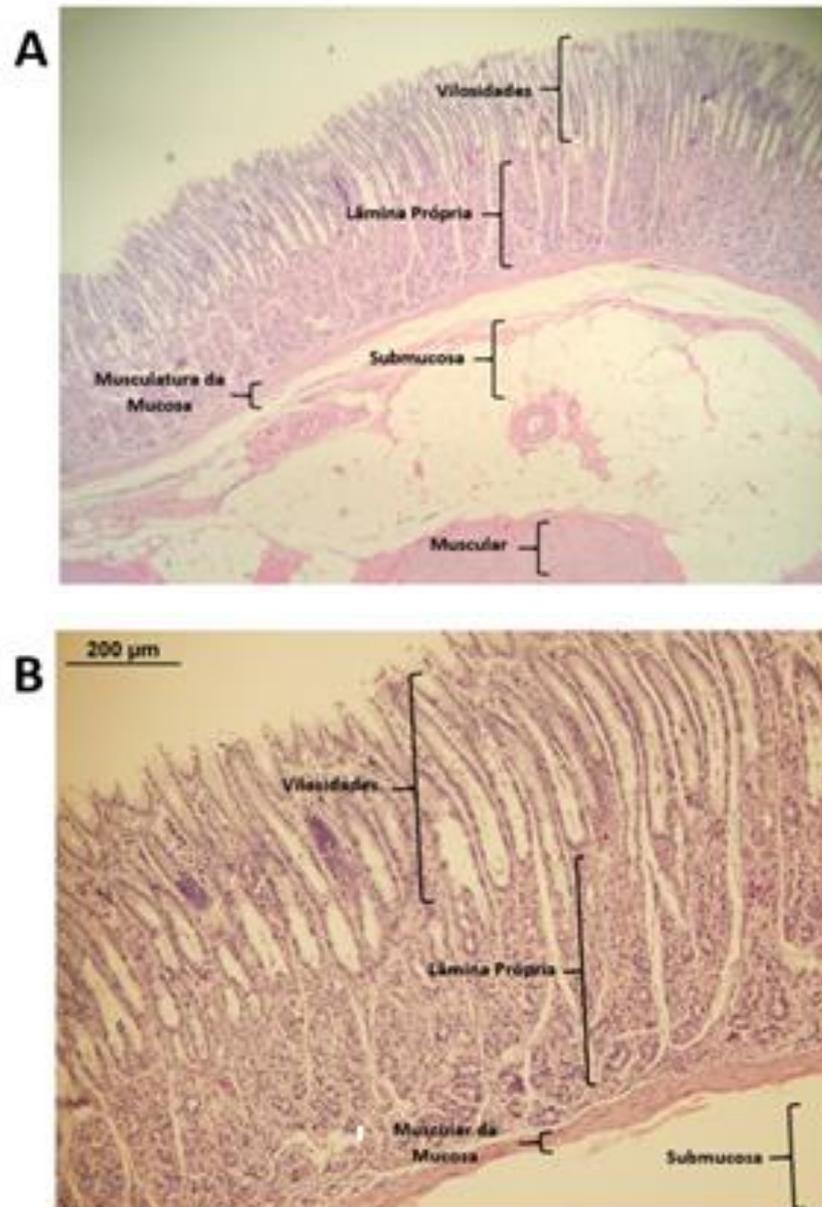
**FIGURA 2** – Distribuição das frequências de bovinos de abatedouro de acordo com a ausência (controle) ou presença de úlcera abomasal (grau 1 ou 2), o manejo nutricional e sexo do animal.



**FIGURA 3** - Classificação das úlceras da região cárdica do abomaso. [A] Abomaso normal – tecido íntegro sem presença de erosões. [B] Grau 1 – ulceração e erosão não perfuradas com mínima lesão na mucosa. [C] Grau 2 – ulceração e erosão não perfuradas combinadas com tecido de desvitalização e sangramento. Setas de cor branca indicam as úlceras.

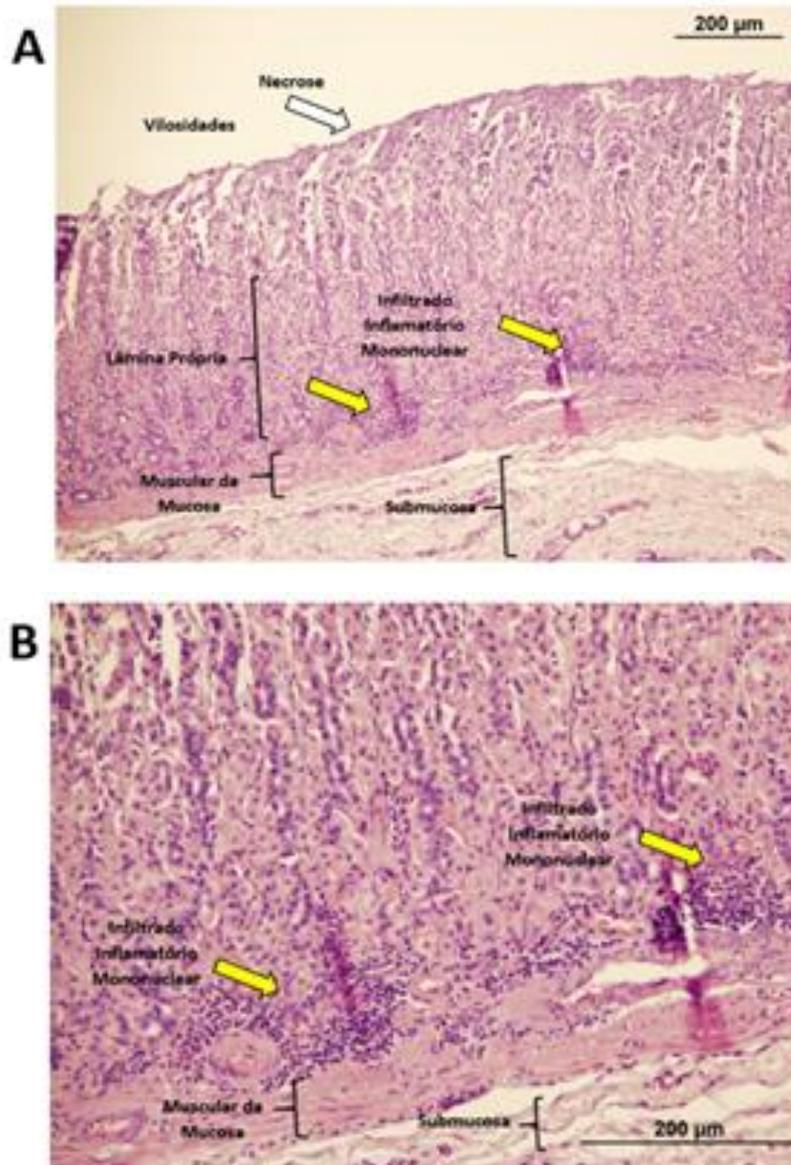
## 4.2 Microscopia

À microscopia de luz, as amostras de abomaso sem lesões apresentaram todas as camadas íntegras: vilosidades, lâmina própria, camadas muscular e submucosa (Figura 4).



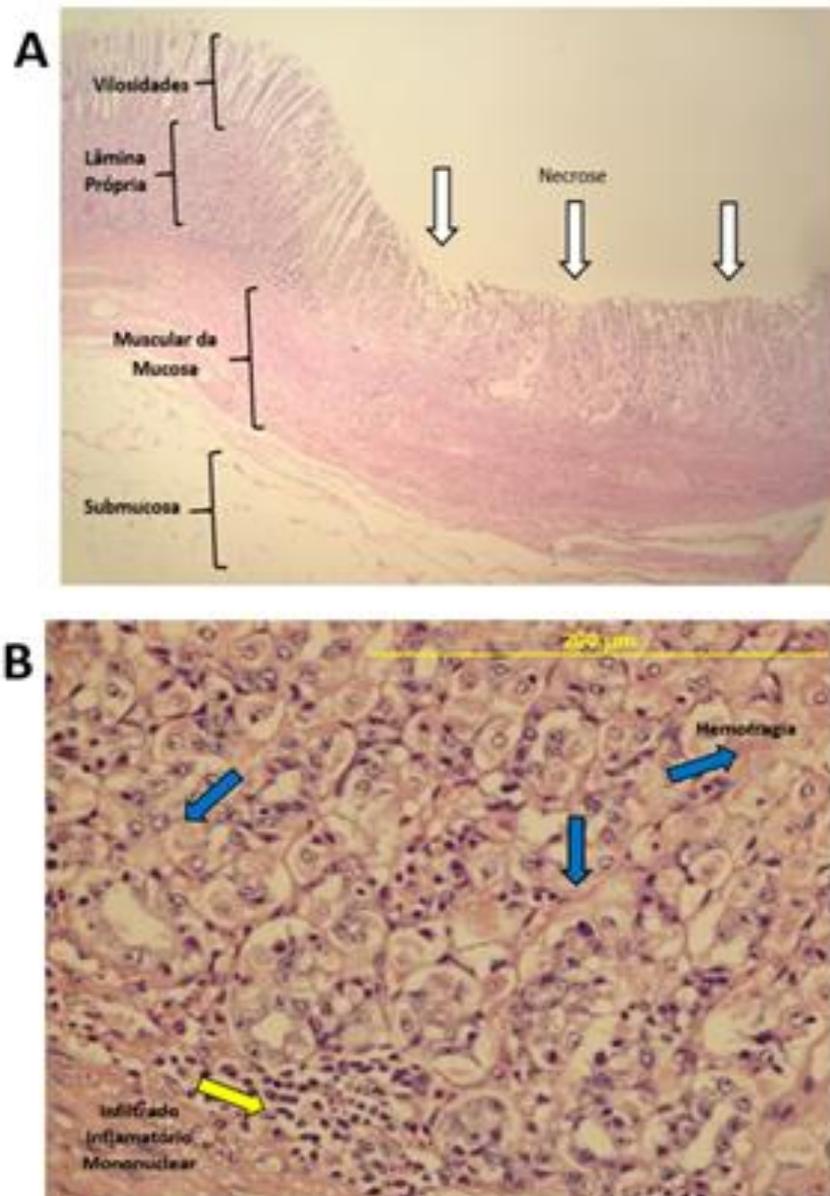
**FIGURA 4** - Corte histológico de tecido de região cárdica de abomaso normal. Observar a integridade de todas as estruturas (A=4x; B=10x). Coloração: HE.

As amostras de tecidos com úlceras de grau 1 apresentaram erosão superficial da mucosa afetando as vilosidades e a lâmina própria, com necrose nas adjacências, com infiltrado inflamatório caracterizado por população de células mononucleares (Figura 5).



**FIGURA 5** - Corte histológico de tecido da região cárdica de abomaso com úlceras de grau 1: (A) presença de lesão com tecido necrótico nas vilosidades (seta de cor branca) (10x); (B) presença de infiltrado inflamatório (seta de cor amarela) (40x). Coloração: HE.

As amostras de tecido com úlceras de grau 2 apresentaram erosão e processo cicatricial avançado tanto na camada muscular quanto na submucosa, além da presença de infiltrado inflamatório (células mononucleares e neutrófilos), sangramento intersticial e neovascularização (Figura 6).



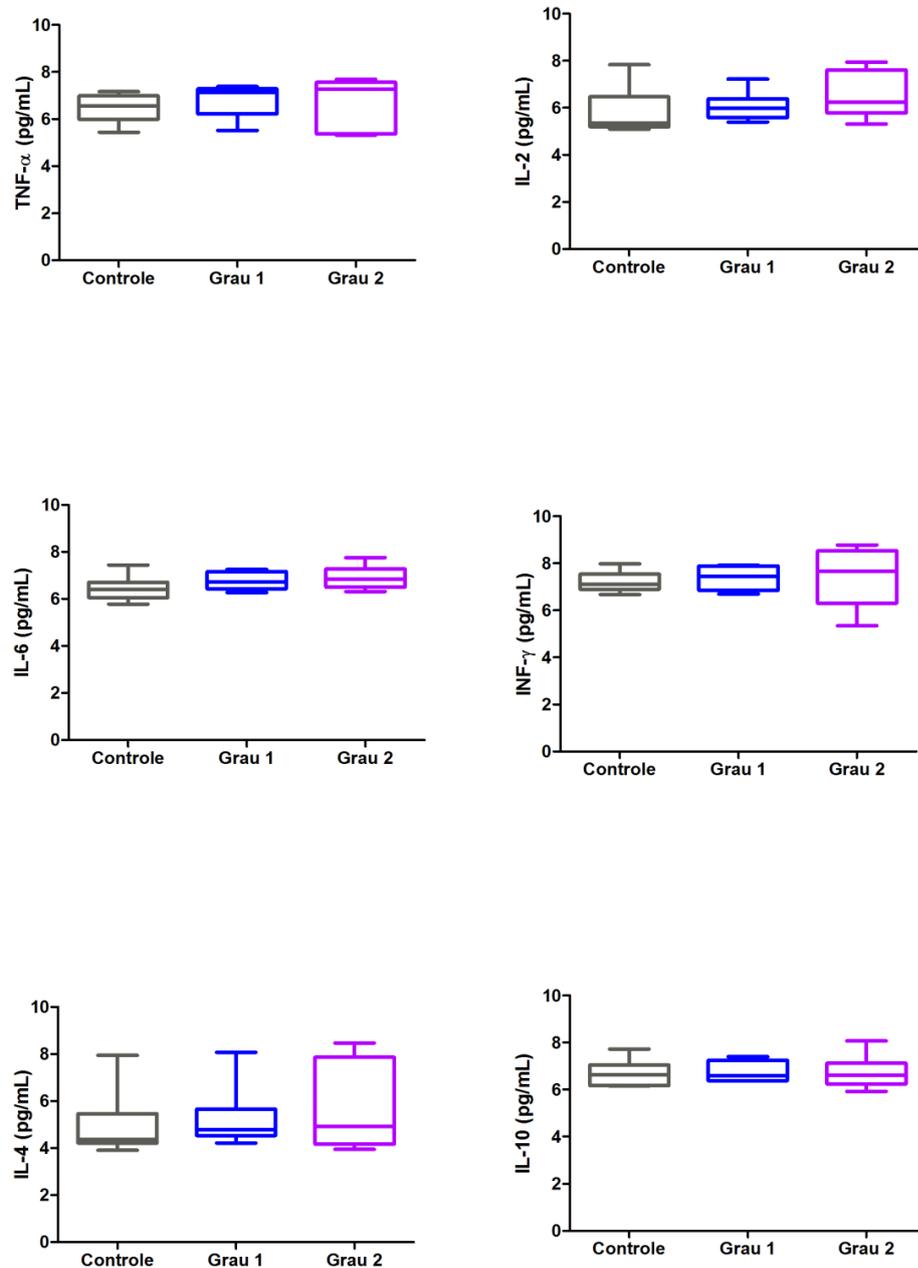
**FIGURA 6** - Corte histológico de tecido da região cárdica de abomaso com úlceras de grau 2: (A) presença de lesão com tecido necrótico na lâmina própria (seta de cor branca), edema na muscular da mucosa (4x); (B) presença de infiltrado inflamatório (seta de cor amarela) e hemorragia intersticial (seta de cor azul) (40x). Coloração: HE.

### **4.3 Concentrações de citocinas**

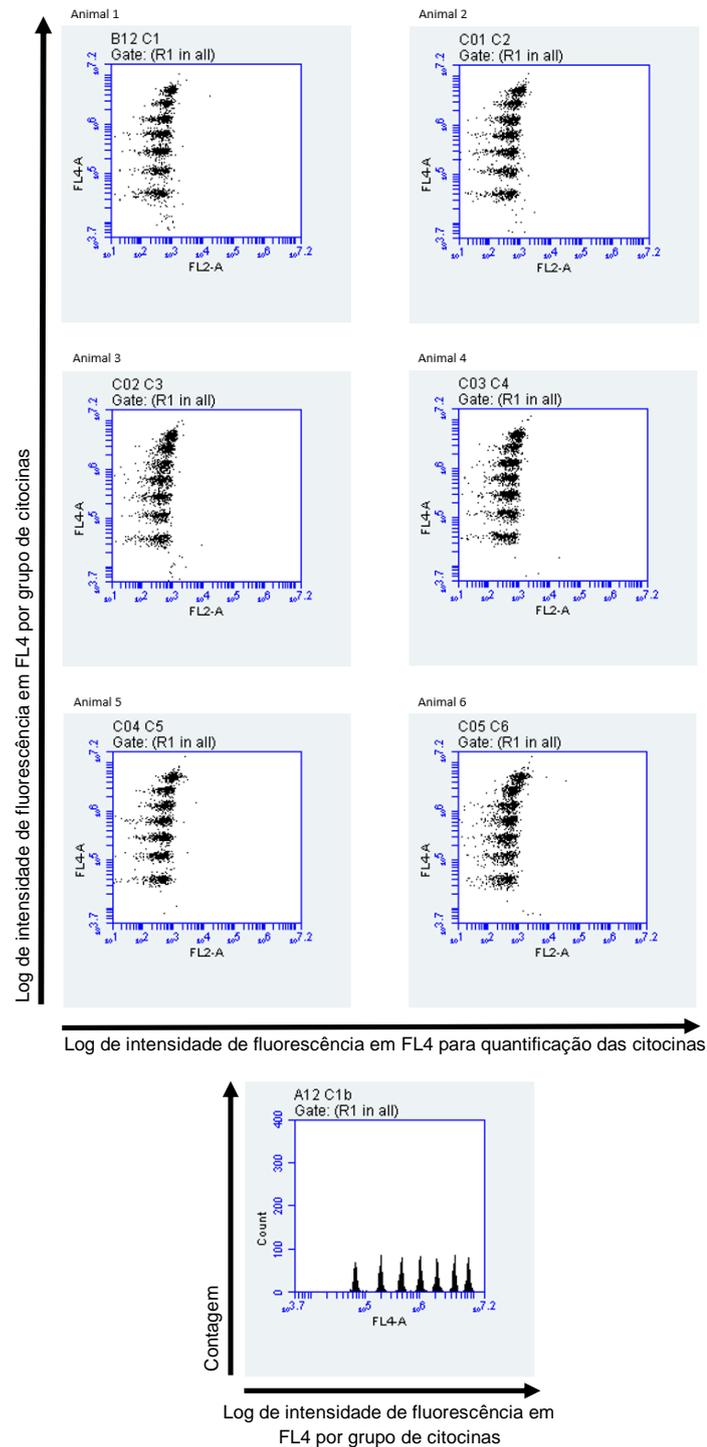
Os valores das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10, encontrados nos líquidos abomasais dos animais do grupo controle, grupo úlceras grau 1 e grupo úlceras grau 2 foram semelhantes (Figura 7). Concentrações de IL-17A não foram detectadas em nenhum dos grupos avaliados (dados não mostrados).

Os gráficos representativos dos “clusters” e picos das citocinas estudadas nos grupos controle, Grau 1 e Grau 2, obtidos pela citometria de fluxo estão representados nas Figuras 8 a 10, respectivamente.

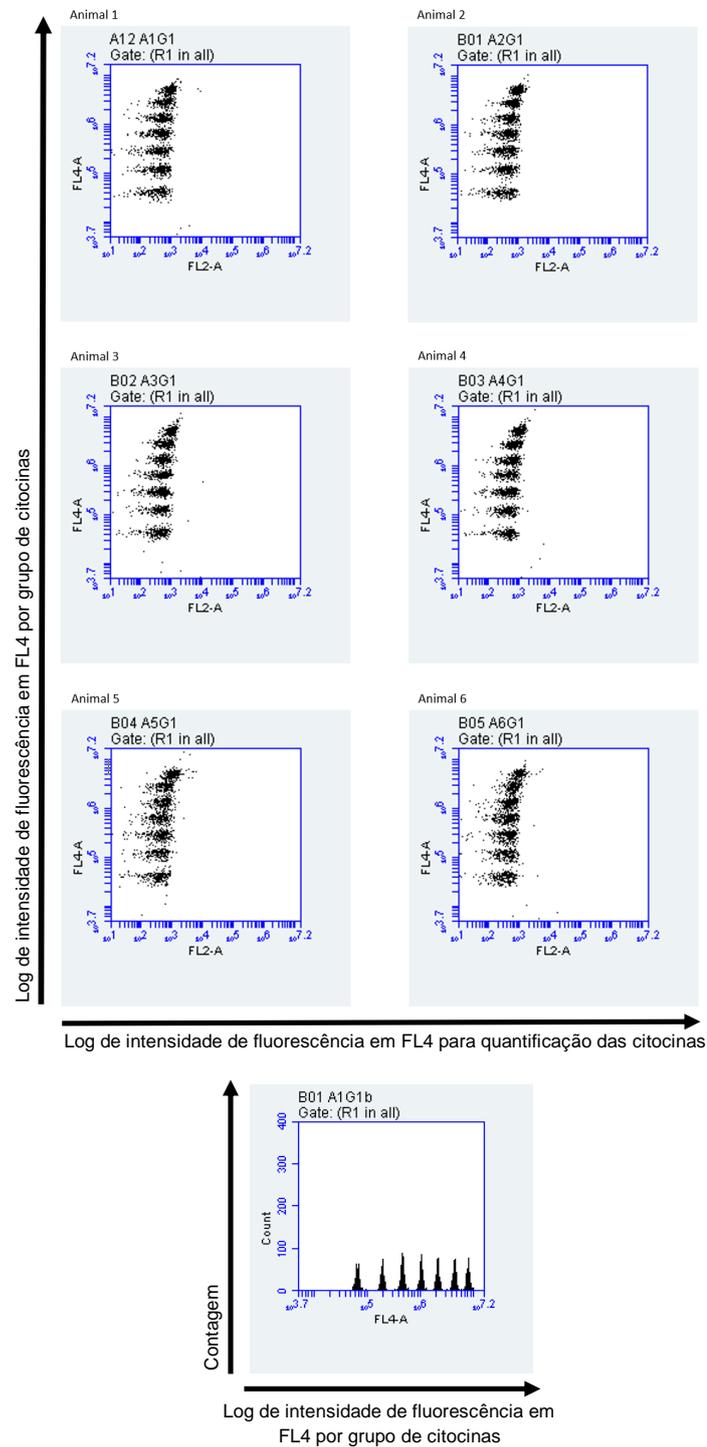
As curvas padrão das mesmas citocinas (Anexo) estão representadas na Figura 11.



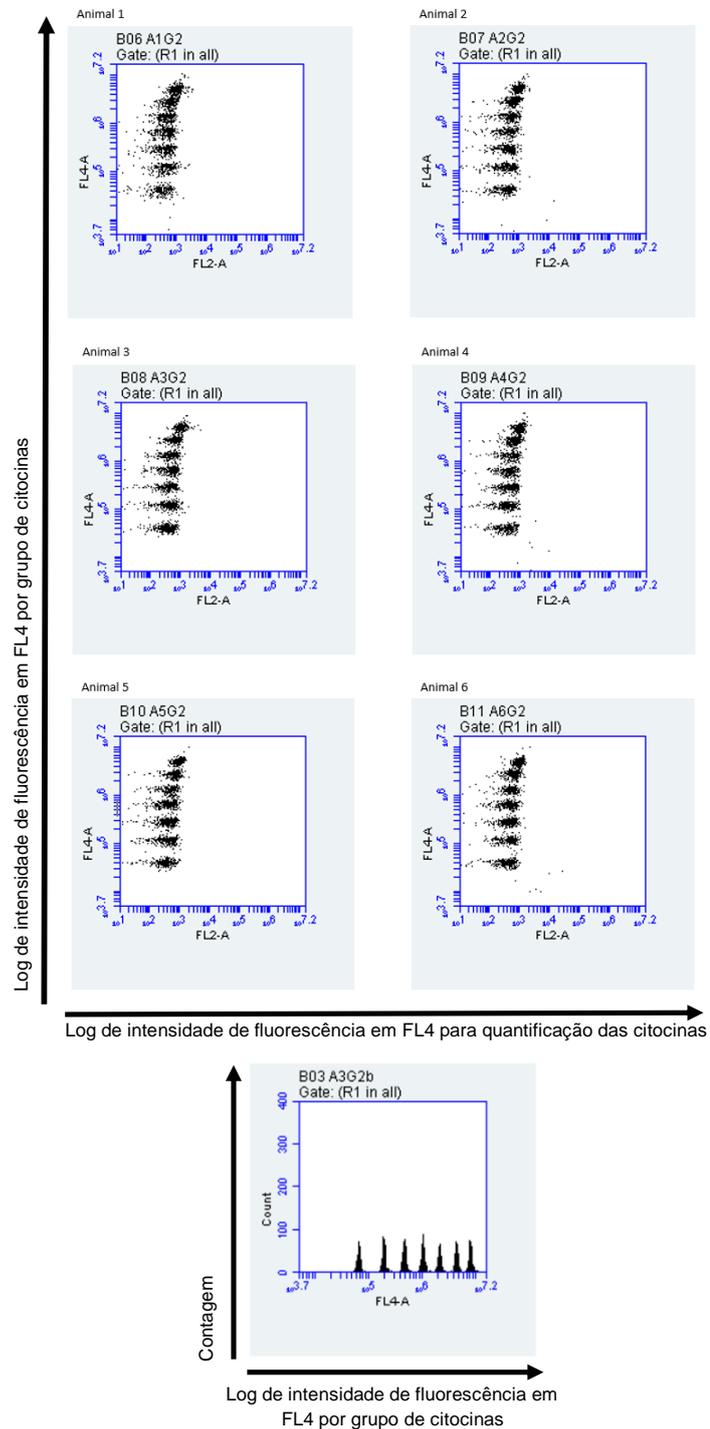
**FIGURA 7** - Concentrações de citocinas (pg/mL) no líquido abomasal de bovinos controle (sem úlceras no abomaso) e com úlceras no abomaso de grau 1, grau 2. As linhas dentro das caixas centrais representam as medianas das concentrações destes mediadores, enquanto os limites superiores e inferiores representam o 75º percentil e o 25º percentil. Os traços superior e inferior representam os 25% superiores ou inferiores da distribuição, respectivamente. Os valores entre os grupos não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis).



**FIGURA 8** – Gráfico representativo obtido pela citometria de fluxo do líquido abomasal do grupo controle para cada citocina (IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2) demonstrando os deslocamentos dos “clusters” e os sete picos individuais respectivamente.



**FIGURA 9** – Gráfico representativo obtido pela citometria de fluxo do líquido abomasal do grupo grau 1 para cada citocina (IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2) demonstrando os deslocamentos dos “clusters” e os sete picos individuais respectivamente.



**FIGURA 10** – Gráfico representativo obtido pela citometria de fluxo do líquido abomasal do grupo grau 2 para cada citocina (IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2) demonstrando os deslocamentos dos “clusters” e os sete picos individuais respectivamente.

## V DISCUSSÃO

As concentrações das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  (Th1), IL-4 e IL-10 (Th2) foram determinados no líquido abomasal e os valores obtidos foram semelhantes entre os animais com presença ou ausência de ulcerações abomasais, exceto para IL-17A (não detectado), indicando que não houve um incremento na liberação dessas citocinas em virtude das ulcerações, havendo um comportamento de equilíbrio entre a resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória.

A reação cruzada entre citocinas e células de espécies diferentes é mais provável quando a mesma citocina em ambas as espécies tem pelo menos 60% de homologia na sua composição de aminoácidos (SCHEERLINCK, 1999). Das citocinas estudadas, apenas a IL-6 apresenta porcentagem de homologia inferior a esse índice (53%), o que confere confiabilidade aos dados obtidos. Em estudos realizados por Dornelles et al. (2015) e Pedersen et al. (2002) para identificar novos indicadores biológicos em ruminantes domésticos, dentre eles o bovino, observaram que houve reação cruzada entre mAbs humanos para IL-6, IL-10, IL-17A e os daquela espécie.

A presença de neovascularização e tecido de granulação no material biológico deste estudo, assim como células inflamatórias com presença de neutrófilos e de mononucleares, indica que está ocorrendo um processo cicatricial. Isso é confirmado por pesquisa realizada recentemente por nosso grupo, utilizando o mesmo material biológico, que apontou aumento da expressão de TLR-2 nos animais dos grupos com úlceras, sugerindo uma ação favorável do TLR-2 ao processo de cicatrização. Nesse mesmo estudo não houve diferença na expressão de HMGB-1 entre os grupos com úlceras 1 e 2 e o grupo controle, sugerindo que há uma pequena destruição tecidual nos animais dos grupos com úlceras, o que foi confirmado pela presença de neovascularização, tecido de granulação e células inflamatórias com predominância de mononucleares (BENTIN, 2016).

Em ratos, após a indução de úlceras gástricas com ácido acético, ocorre extensa morte celular pelo aumento da HGMB1 e por consequência, o aumento de TNF- $\alpha$  (NADATANI et al., 2013). Em úlceras abomasais tipo 1 e 2, este grupo de pesquisa demonstrou que a expressão de HMGB1 destes mesmos animais do nosso estudo foi semelhante àquela do grupo sem ulceração (BENTIN, 2016). A expressão gênica inalterada de HMGB1 e a ausência da IL-17A corroboram o fato de não ter ocorrido elevação nas concentrações das demais citocinas no líquido abomasal no presente estudo.

Em suínos, a granulometria do concentrado interfere diretamente no índice de desenvolvimento de úlceras gástricas em animais em terminação, sendo que rações fareladas diminuem o aparecimento de úlceras (MELNICHOUK, 2002). Nos equinos as úlceras gástricas são frequentes, podendo levar a limitações na performance em animais adultos e foi observado um aumento nos níveis de mRNA de TNF- $\alpha$  e IL-13 nos tecidos gástricos dos animais que apresentaram úlceras gástricas (PIETRA et al., 2010). Em cães, há uma ativação de citocinas pró-inflamatórias e citocinas imunomoduladoras, com aumento na expressão dessas citocinas nas enfermidades das mucosas do sistema digestivo nas gastrites. A ausência, na maioria das vezes, da expressão de IL-4 na mucosa gástrica dos cães com gastrite sugere que, assim como em humanos (BODGER et al., 1997; HOLCK et al., 2003; LINDHOLM et al., 1998;) e gatos com gastrite associadas à infecção por *H. pylori*, a resposta seja mais de perfil Th1 do que Th2 (EATON et al., 1996; HAPPONEN et al., 1996; NEIGER et al., 1999; SIMPSON et al., 1999). O perfil alimentar diferente e constante envolvimento de bactérias no desenvolvimento das úlceras nessas espécies pode ser a justificativa dessa resposta inflamatória em monogástricos.

No conteúdo rumenal de bovinos coletado de animais saudáveis e animais que apresentaram reações inflamatórias em lesões nos membros locomotores a resposta inflamatória foi semelhante, sendo detectada a presença de células inflamatórias (linfócitos T e B) em baixa frequência, assim como a concentração de citocinas (INF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ) foi baixa. O mesmo ocorreu com o líquido rumenal obtido de animais que foram abatidos em consequência de

doenças mais graves (laminite, metrite ou deslocamento de abomaso). No líquido rumenal de animais tratados com dietas ricas em carboidratos, os valores das populações de leucócitos e das citocinas (INF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ) foram ainda mais baixos, caracterizando uma inibição na resposta inflamatória no interior do órgão causada pela dieta (TREVISE et al., 2014). Respostas inflamatórias do sistema imune inato podem ser iniciadas, mantidas ou aumentadas nos pré-estômagos de bovinos por meio de um sistema integrado incluindo-se receptores, moléculas sinalizadoras, citocinas e leucócitos inflamatórios (TREVISE et al., 2014). O comportamento das citocinas no líquido abomasal em nosso estudo foi semelhante ao observado nos pré-estômagos de bovinos (TREVISE et al., 2014). Portanto, a cicatrização das lesões observadas nos abomasos avaliados ocorreu sem a necessidade de uma resposta inflamatória local aumentada.

Úlceras e erosões são achados comuns no abomaso dos bovinos. As principais causas estão ligadas ao manejo e nutrição. Manejos intensivos visando potencializar performances produtivas submetem os animais a situações de estresse, assim como a alterações nutricionais que os predispõe ao aparecimento de úlceras gástricas (GOZHO et al., 2007; MARSHALL, 2009; MILLS et al., 1990; NIEHALS, 2008; PERKINS, 2004; RADOSTITS, 2002). Dietas com grandes quantidades de grãos, altamente energéticas, favorecem o desenvolvimento de distúrbios metabólicos. A acidose rumenal e a acidose rumenal subaguda são os principais exemplos desses distúrbios metabólicos e tem ligação direta com respostas inflamatórias que incrementam a produção de histamina e a absorção de LPS, que podem levar a alterações na mucosa do aparelho digestivo ou alterações vasculares em outros locais do organismo (GOZHO et al., 2007).

Este é o primeiro estudo sobre níveis de citocinas no conteúdo abomasal de acordo com a literatura consultada até o momento. Esperava-se encontrar maior número de animais com úlceras de abomaso nos lotes de animais de confinamento, por serem alimentados com grandes quantidades de grãos. Apesar da coleta ter sido aleatória, os abomasos com úlceras foram mais frequentes nos lotes de animais provenientes de pastagens. Pastagens mal

manejadas ou com plantas em final de ciclo vegetativo, duas situações muito comuns nos sistemas de manejo de gado de corte no período do ano em que coletamos as amostras (junho, julho e agosto de 2015), disponibilizam aos animais forrageiras com alta porcentagem de fibra, de difícil digestão, que favorecem as abrasões na mucosa do aparelho gastrintestinal, levando ao aparecimento das lesões.

## **VI CONCLUSÃO**

As citocinas estudadas foram detectadas no líquido abomasal. Não houve aumento da liberação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 e IL-10 no líquido abomasal dos animais com úlceras de abomaso em relação aos animais sem ulceração de abomaso, indicando um comportamento equilibrado entre os perfis Th1 e Th2 na resposta imune dos bovinos em relação às úlceras da região cárdica do abomaso.

## VII REFERÊNCIAS

BENTIN, L.A.T. **Expressão gênica de TLR-2, TLR-4, HMGB1 e VEGF em úlceras abomasais em bovinos de corte.** Araçatuba, 2016. 37p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Araçatuba, 2016.

BODGER, K.; WYATT, J.I.; HEATLEY, R.V. Gastric mucosal secretion of interleukin-10: relations to histopathology, *Helicobacter pylori* status, and tumour necrosis factor-alpha secretion. **Gut**, v.40, p.739–744, 1997.

CASTEEL; S.W.; TURK, J.R. Colapso / morte súbita. In: BRADFORD, P.S. **Medicina interna de grandes animais.** 3. ed. Barueri-SP: Manole, 2006. p. 247

CLARK, R. A. F. (Ed).The Molecular and cellular biology of wound repair. 2<sup>nd</sup>. Ed. New York: Plenum Press, 996. In: TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive diseases and sciences**, v. 50 Suppl 1, p. S24-33, 2005.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Gastric ulceration. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins pathologic basis of disease.** 5<sup>th</sup>. ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p 298–299, 773– 777

CURFS, J. H. A. J.; MEIS, J. F. G. M.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A. A Primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 742–780 1997.

DILDA, F. et al. Distribution of acute phase proteins in the bovine forestomachs and abomasums. **The Veterinary Journal**, v.192, p.101–105, 2012

DOMMETT, R. et al. Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. **Molecular Immunology**, v. 42, n.8, p. 903–912, 2005.

DORNELES, E.M.S. et al. Cross-reactivity of anti-human cytokine monoclonal antibodies used as a tool to identify novel immunological biomarkers in domestic ruminants. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.1, p. 940-951, 2015.

DUKES, T. W. Perforation of an abomasal ulcer through the diaphragm of a cow: case report. **Canadian Veterinary Journal**, v.7, n.4, p.88 – 90, 1966.

DURAMAD, O. et al. Inhibitors of TLR-9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation. **Journal of Immunology**, v.174, p. 5193–5200. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/content/174/9/5193.full.pdf+html>>. Disponível em: 27 sete. 2015.

EATON, K. A. et al. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n.12, p. 3165–3170, 1996.

GUARD, C. Úlceras abomasais. In: BRADFORD, P. **Smith medicina interna de grandes animais**. 3. ed. Barueri-SP: Manole, 2006. p. 760-762.

GOZHO, G.N.; KRAUSE, D.O.; PLAIZIER, J.C. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p. 856–866, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207715692>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

HAPPONEN, I. et al. Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter*-like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A**, v. 43, n. 5, p. 305-315, 1996.

HOLCK, S. et al. Gastric mucosal cytokine responses in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis and peptic ulcers. Association with inflammatory parameters and bacteria load. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 175–180, 2003.

HUND, A. et al. Characterization of mucosa-associated bacterial communities in abomasal ulcers by pyrosequencing. **Veterinary Microbiology**, v.177, p.132–141, 2015.

JASSIM, A.; YOUSIF, A. A. R.; KSHASH, Q. H. Study on Abomasal Ulcer in Sheep in Iraq. **International Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 1, p. 342-349, 2014.

LIN, E.; CALVANO, S.E.; LOWRY, S.F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p.117-126, 2000.

LINDHOLM, C. et al. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. **Infection and Immunology**, v. 66, p. 5964–5971, 1998.

MARSHALL, T. S. Abomasal ulceration and tympany of calves. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v.25, p. 209–220, 2009. doi:10.1016/j.cvfa.2008.10.010.

MELNICHOUK, S. I. Mortality associated with gastric ulceration in swine. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n.3, p.223–225, 2002.

MILLS, K. W. et al. Laboratory findings associated with abomasal ulcers/tympy in range calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 208-212, 1990.

MUELLER, K.; MERRALL, M.; SARGISON, N. D. Left abomasal displacement and ulceration with perforation of abdominal musculature in two calves. **The Veterinary Journal**, v.157, n. 1, p. 95–97, 1999.

NADATANI, Y. et al. High-mobility group box 1 inhibits gastric ulcer healing through Toll-like receptor 4 and receptor for advanced glycation end products. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80130, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0080130. eCollection 2013.

NEIGER, R. et al. Diagnosis and identification of gastric *Helicobacter* species by polymerase chain reaction in dogs. **Microbial Ecology in Health and Diseases**, v. 11, p. 234–240, 1999.

NIEHAUS, A. J. Surgery of the abomasum. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 24, p. 349–358, 2008.

OLIVEIRA, C.M.B. et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 255-265, 2011.

PALMER, J. E.; WHITLOCK, R. H. Bleeding abomasal ulcers in adult daily cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, p. 448–451, 1983.

PEDERSEN, L. G. et al. Identification of monoclonal antibodies that cross-react with cytokines from different animal species. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 88, p. 111-122, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242702001393>>. Acesso em: 20 jan.16).

PIETRA, M. et al. Comparison of endoscopy, histology, and cytokine mRNA of the equine gastric mucosa. **Veterinary Research Communications**, v. 34 n. Suppl 1, p. S121–S124, 2010. DOI 10.1007/s11259-010-9401-6

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 302-305

SASAKI, H. et al. Perforating abomasal ulcer caused by yolk sac tumor in a Holstein calf. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 4, p.804–806, 2012. DOI: 10.1177/1040638712448789.

SATTLER, N. et al. Etiology, forms, and prognosis of gastrointestinal dysfunction resembling vagal indigestion occurring after surgical correction of right abomasal displacement. **Canadian Veterinary Journal**, v. 41 p.777-785, 2000.

SCHEERLINCK, J-P Y. Functional and structural comparison of cytokines in different species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 39-44, 1999.

SIMPSON, K. W. et al. Gastric function in dogs with naturally acquired gastric *Helicobacter* spp. infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, p. 507–515, 1999.

TARNAWSKI, A. Cellular mechanisms of gastric ulcer healing. In: DOMSCHKE, W.; KONTUREK, S. J. (Ed.). **The Stomach**. Berlin Heidelberg: Springer, 1993. Chap. 12, p.177-192.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive diseases and sciences**, v. 50 Suppl. 1, p. S24-33, 2005.

TARNAWSKI, A.; HALTER, F. Cellular mechanisms, interactions, and dynamics of gastric ulcer healing. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 21, n. Suppl. 1, p. S93-7, 1995.

TARNAWSKI, A. et al. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? **Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement**, v. 210, p. 9-14, 1995.

TARNAWSKI, A. et al. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. **Journal of Physiology Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 337-44, 2001.

THARWAT, M.; AHMED, A.F. Abomasal ulceration in buffaloes and cattle: clinico-biochemical and pathological findings. **Journal of Animal Veterinary Advances**, v. 11, p.1327-1331, 2012.

TRENT, A M. Surgery of the bovine digestive system. In: FUBINI, S L.; DUCHARME, N. G. **Farm animal surgery**. 1. ed. St Louis, Missouri: Saunders, 2004. p. 232 – 234.

TREVISI, E. et al. Evaluation of innate immune responses in bovine forestomachs. **Research in Veterinary Science**, v. 96, p. 69–78, 2014.

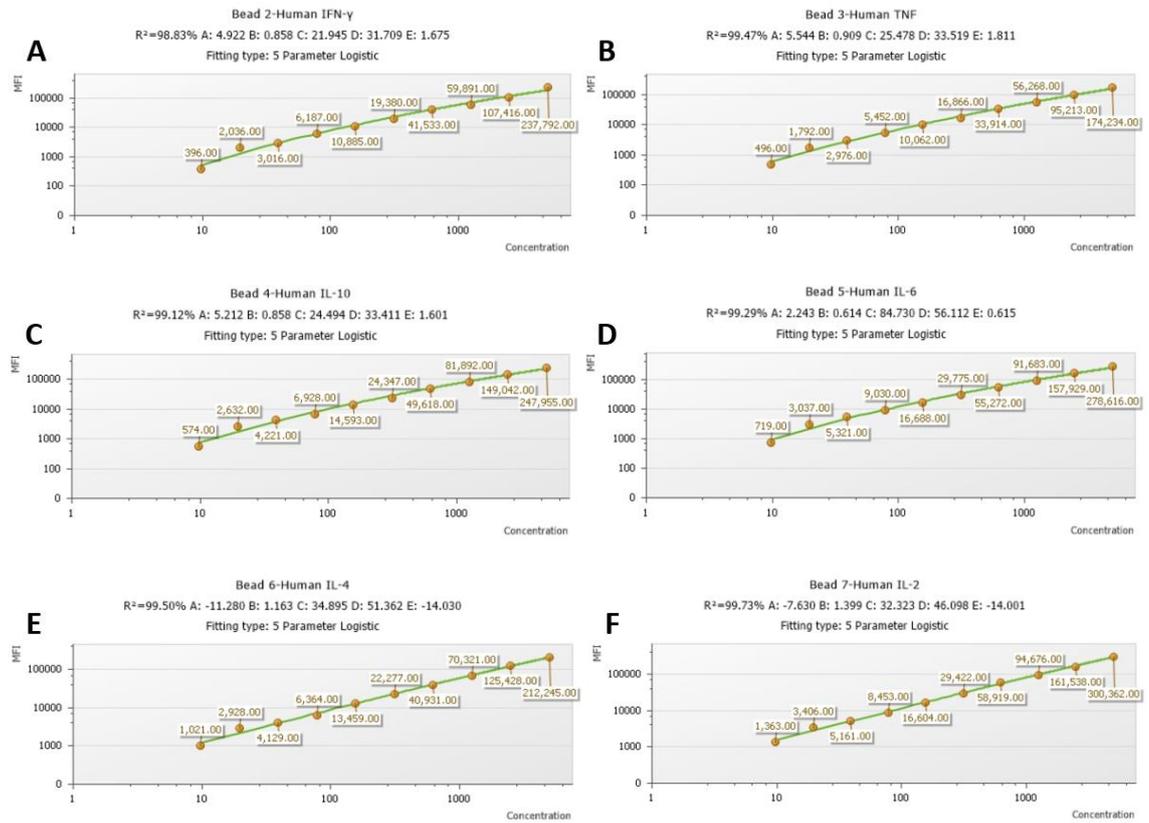
TREVISI, E. et al. Metabolic changes in dairy cows induced by oral, low-dose interferon-alpha treatment. **Journal of Animal Science**, v.87, p. 3020–3029, 2009.

TULLENERS, E. P.; HAMILTON, G. F. Surgical resection of perforated abomasal ulcers in calves: case report. **Canadian Veterinary Journal**, v. 21, p. 262-264, 1980.

WELCHMAN, D. D. B.; BAUST, G. N. A survey of abomasal ulceration in veal calves. *Veterinary-Record*, v. 121, p. 586–590, 1987. In: MUELLER, K.; MERRALL, M.; SARGISON, N. D. Left abomasal displacement and ulceration with perforation of abdominal musculature in two calves. **The Veterinary Journal**, v.157, n. 1, p. 95–97, 1999.

WIINBERG, B. et al. Quantitative analysis of inflammatory and immune responses in dogs with gastritis and their relationship to *helicobacter* spp. infection. **Journal of Veterinary of Internal Medicine**, v. 19, n. 1, p. 4–14, 2005.

## APÊNDICE



**FIGURA 11** - (A-F) curvas padrões das citocinas onde o eixo X corresponde a concentração e o eixo Y corresponde à média de intensidade de fluorescência, com seus respectivos  $R^2$ . Imagens obtidas do software FCAP array 3.0.