

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**PERFIL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS E NO LÍQUIDO
PERITONEAL EM BEZERROS PORTADORES DE
HÉRNIA UMBILICAL ANTES E APÓS HERNIORRAFIA**

Bianca Arnone
Médica Veterinária

ARAÇATUBA - SP
2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**PERFIL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS E NO LÍQUIDO
PERITONEAL EM BEZERROS PORTADORES DE
HÉRNIA UMBILICAL ANTES E APÓS HERNIORRAFIA**

Bianca Arnone

Orientadora: Prof^a 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

2013

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

Arnone, Bianca

A763r

Perfil de citocinas plasmáticas e no líquido peritoneal em bezerros portadores de hérnia umbilical antes e após herniorrafia / Bianca Arnone. -- Araçatuba: [s.n], 2013.
61 f. il.; + CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2013.

Orientadora: Profª Adjunto Juliana Regina Peiró

1. Bovinos. 2. Interleucinas. 3. Citometria de fluxo. 4. Resposta imunológica. I. T.

CDD 636.01092

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Perfil de citocinas plasmática e no líquido peritoneal em bezerros portadores de
hérnia umbilical antes e após herniorrafia.

AUTORA: BIANCA ARNONE

ORIENTADORA: Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dra. FLÁVIA DE ALMEIDA LUCAS


Dr. JOSÉ PAES DE OLIVEIRA FILHO


Dra. MÁRCIA MARINHO


Dr. FERNANDO JOSÉ BENESI


Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ

DATA DA REALIZAÇÃO: 13 de dezembro de 2013.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

BIANCA ARNONE - nascida em Mogi das Cruzes, São Paulo, em 30 de outubro de 1981, graduação em Medicina Veterinária pela Universidade de Guarulhos, Guarulhos, São Paulo, concluída em 2003. Especialização (*latu senso*) em Reprodução Bovina, pela Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo em 2006. Mestre em Ciência Animal, área de concentração Reprodução Bovina, pela Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo em 2008. Bolsista de Doutorado CAPES (2011-2013). Atualmente docente na Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias (FAIT) no curso de Medicina Veterinária, Itapeva, São Paulo.

**“TUDO POSSO...
NAQUELE QUE ME FORTALECE”
Filipenses 4:13.**

Dedico aos meus pais Antonio Carlos Arnone e Marize G. Montoni Arnone, pois tudo que conquistei na minha vida foi por causa de vocês. Vocês me ensinaram a enfrentar os desafios de cabeça erguida, sempre acreditar nos sonhos e nunca desistir. São meus exemplos de vida, perseverança e humildade.

Amo vocês e muito obrigada por tudo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força para superar os obstáculos e sabedoria para tomar as decisões certas.

Aos meus pais, obrigado por tudo, pois vocês são meus alicerces e sem vocês não teria conseguido ir até o fim. Amo Vocês!!!

À minha filha Isabella, você é tudo para mim e agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida. A sua existência me dá força para conseguir os meus objetivos. Amo você incondicionalmente!

Ao meu namorado André, pela paciência e por estar ao meu lado em todos os momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do financiamento do projeto (Processo 2012/00334-3).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Doutorado (2011- 2013).

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, na pessoa de sua Coordenadora Professora Adjunto Juliana Regina Peiró, pela oportunidade de conhecimento e crescimento pessoal e profissional.

À minha orientadora Professora Adjunto Juliana Regina Peiró pelos ensinamentos durante a execução deste projeto.

À Sra. Isabel Pereira de Matos, Bibliotecária Chefe da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, pela revisão final desta tese para que estivesse de acordo com as normas de publicação do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

À minha amiga Tatiane Poló, você é um anjo que Deus colocou na minha vida, uma pessoa de coração enorme a qual serei eternamente grata por tudo que fez por mim. Muito Obrigada!

Aos meus amigos pós-graduandos, Juliana Alves Nunes, Leonardo Teixeira Bentin e Priscila Dalmagro. Nós formamos uma equipe de verdade e vou carregar vocês para sempre no meu coração. Obrigado!

Aos meus amigos, Maurício, Luís, Bianca Gerardi, Larissa, Jefferson, pelos momentos de apoio e descontração.

As alunas de iniciação científica Gabriela Silva Campos e Marília Campos Martins, pelo esforço e dedicação aos animais.

A todos que contribuíram de alguma maneira com o sucesso deste projeto. Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	10
Abstract.....	11
I. INTRODUÇÃO.....	12
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Células T helper (Th) – Citocinas.....	14
2.2 TNF- α	15
2.3 IL-2.....	16
2.4 IL-4.....	16
2.5 IL-6.....	17
2.6 IL-10.....	17
2.7 IL17A.....	18
2.8 INF- γ	19
III. MATERIAL E MÉTODO.....	21
3.1 Animais.....	20
3.2 Delineamento experimental.....	20
3.3 Amostras.....	23
3.3.1 Plasma.....	23
3.3.2 Líquido peritoneal.....	23
3.4 Procedimento Cirúrgico.....	24
3.5 Determinações das concentrações de citocinas plasmáticas e no líquido peritoneal por citometria de fluxo (CBA).....	25
3.6 Análise estatística.....	26
IV. RESULTADOS.....	28
V. DISCUSSÃO.....	39
VI. CONCLUSÃO.....	47
VII. REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICE.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
IFN- γ	interferon gama
IL-10	interleucina 10
IL-17A	interleucina 17 ^a
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
mg	miligrama
mL	mililitro
NK	células natural killer
pg	picograma
rpm	rotações por minuto
Tfh	células T helper follicular
Th	células T helper
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
Treg	células T reguladoras
μ L	microlitro

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Concentrações de TNF- α em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em intervalos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança).....	30
Tabela 2 – Concentrações de IL-2 em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em intervalos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança).....	31
Tabela 3 – Concentrações de IL-6 em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em intervalos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança).....	32
Tabela 4 – Concentrações de IFN- γ em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em intervalos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de	

confiança)..... 33

Tabela 5 – Concentrações de IL-17A em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em intervalos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança)..... 34

Tabela 6 – Concentrações de IL-4 em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em intervalos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança)..... 35

Tabela 7 – Concentrações de IL-10 em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em intervalos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança)..... 36

PERFIL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS E NO LÍQUIDO PERITONEAL EM BEZERROS PORTADORES DE HÉRNIA UMBILICAL ANTES E APÓS HERNIORRAFIA

RESUMO – As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo à cicatrização apropriada da ferida. Também são indicadores sensíveis da reação inflamatória pós-operatória e podem ser indicadores de complicações cirúrgicas graves. Os objetivos foram determinar qual o perfil da resposta imunológico (Th1 ou Th2) que os bezerros portadores de hérnias umbilicais apresentam antes e após a correção cirúrgica, por meio das variações das concentrações das citocinas: TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A e IFN- γ ; e estabelecer intervalo de referência para estas citocinas no plasma e no líquido peritoneal de bezerros antes e após a herniorrafia. A determinação das concentrações das citocinas foi realizada por meio de citometria de fluxo. Antes da cirurgia (momento 0) as concentrações plasmáticas de TNF- α estavam elevadas, e 24 horas após a cirurgia houve aumento das concentrações plasmáticas de IL-4 e IL-10 no grupo experimental. Não houve aumento nas concentrações de nenhuma citocina no líquido peritoneal entre os grupos nos momentos avaliados. Conclui-se que os animais portadores de hérnia umbilical antes da correção cirúrgica apresentaram uma resposta pró-inflamatória (TNF- α). Após a correção cirúrgica apresentaram um perfil de resposta Th2, ou seja, anti-inflamatória (IL-4 e IL-10) em comparação aos animais sadios. Sugerimos que os valores de concentrações de citocinas no plasma e no líquido peritoneal encontrados neste estudo possam ser utilizados como intervalos de referência para a espécie.

Palavras-chave: bovinos, interleucinas, citometria de fluxo, resposta imunológica

PLASMA AND PERITONEAL FLUID CYTOKINE PROFILE OF CALVES UMBILICAL HERNIA BEFORE AND AFTER HERNIORRAPHY

SUMMARY – Cytokines are mediators necessary to drive the local inflammatory response to infection and injury, promoting proper healing of the wound. Also are sensitive indicators of postoperative inflammatory reaction and can be indicators of serious surgical complications. The objectives of this study were to determine the profile of the immune response (Th1 or Th2) in calves with umbilical hernias before and after herniorrhaphy by measuring the plasma and peritoneal fluid concentrations of TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A and IFN- γ , and to establish a reference range for these cytokines in plasma and peritoneal fluid from calves before and after the hernia repair. The concentrations of cytokines was determined by flow cytometry. Plasma concentrations of TNF- α were high before surgery (time 0), whereas an increase in plasma concentrations of IL-4 and IL-10 was observed at 24 hours after surgery there was in the experimental group. There was no increase in concentrations of any cytokine in the peritoneal fluid between groups during the moments evaluated. It is concluded that animals with umbilical hernia before surgical correction showed a pro-inflammatory (TNF- α) response. After surgery, a Th2 anti-inflammatory response (IL-4 and IL-10) was observed compared to healthy animals. We suggest that the plasma and peritoneal fluid cytokine concentrations observed in this study might be used as reference intervals for calves.

Keywords: cattle, interleukines, flow cytometry, immune response.

I. INTRODUÇÃO

As hérnias umbilicais representam o defeito congênito mais comum em bezerros (POTTTER, 2007; TRENT; SMITH, 1984). Podem ocorrer em todas as raças de bovinos e são determinadas por fatores hereditários (MULLER et al., 1988; RINGS, 1995) ou estão associadas secundariamente com onfalites (RINGS, 1995). Nos bezerros a incidência é de 8 a 30% (BAHR; DISTL, 2005; PEIRÓ et al., 2009), enquanto que em potros é de 0,5 a 2% (PEYTON, 1981; ROBERTSON, 1980), podendo ocorrer complicações como o encarceramento e estrangulamento de alça intestinal em ambas as espécies (RINGS, 1995).

As hérnias são compostas por um anel e saco herniário, peritônio que podem conter líquido peritoneal e vísceras. A víscera mais encontrada como conteúdo herniário em bezerros é o abomaso, associado ou não ao omento (RINGS, 1995). Ao nascimento podem apresentar-se pequenas e aumentarem conforme a idade e desenvolvimento dos reservatórios gástricos (ANDERSON, 2004). Quando simples (sem complicações) são redutíveis, enquanto nas formas complicadas pode haver encarceramento de vísceras geralmente com estrangulamento ou infecção concomitante das estruturas umbilicais (ANDERSON, 2004). Hérnias com um diâmetro do anel herniário menor de dois cm frequentemente regridem sem tratamento (GREENWOOD; DUGDALE, 1993; RILEY et al., 1996). Para hérnias maiores que não se resolvem espontaneamente, e aquelas que são irredutíveis ou associadas a estrangulamento intestinal, a herniorrafia é recomendada (GREENWOOD; DUGDALE, 1993; RILEY et al., 1996).

A análise do líquido peritoneal é considerada um meio auxiliar de diagnóstico nas desordens abdominais de bovinos, pois através do líquido peritoneal pode-se analisar celularidade e características proteicas indicando ou não uma inflamação da cavidade peritoneal (OEHME, 1969). Lesões adicionais ou complicações podem desenvolver-se durante o pós-operatório (ANDERSON et al. 1993; PEIRÓ et al., 2009) e a determinação prévia dos

valores das variáveis do líquido peritoneal no pós-operatório é importante para a subsequente análise e interpretação dos achados no líquido peritoneal (ANDERSON et al., 1994). Em equinos, a análise do líquido peritoneal é usada para estabelecer o prognóstico em casos de dor abdominal (ALLEN et al., 1986; ORSINI et al., 1991). Está demonstrado que os valores de referência estabelecidos para constituintes do líquido peritoneal de bovino adulto sadio não podem ser aplicados para interpretação do resultado da análise de líquido peritoneal de bezerros normais (ANDERSON et al., 1995; MENDES et al., 2005) ou com hérnia umbilical (PEIRÓ et al., 2009).

As citocinas são polipeptídeos produzidos em resposta a micro-organismos e outros antígenos, que mediam e regulam reações imunológicas e inflamatórias (ABBAS et al., 2009). São mediadores necessários para promover a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida. No entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos (LIN et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011; SOMMER; WHITE, 2010). Após lesões ou infecções graves, a resposta exacerbada e persistente de citocinas Th1 pode contribuir para lesões em órgão-alvo, levando a insuficiência de múltiplos órgãos e a morte. As citocinas Th2 podem minimizar alguns desses efeitos indesejáveis (LIN et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011; SOMMER; WHITE, 2010). Em geral são indicadores sensíveis da reação inflamatória pós-operatória, assim como de complicações cirúrgicas graves (JANSSON et al., 2004). Portanto, a monitoração das concentrações de citocinas no líquido peritoneal após a cirurgia gastrointestinal eletiva pode ser usada como indicador de complicações intra-abdominais (HERWIG et al., 2002; ZHU et al., 2013).

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células T helper (Th) - Citocinas

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDA. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por aquelas do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinases por mitógenos. Elas atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras). Algumas citocinas podem ter ações pró- (Th1) ou anti-inflamatórias (Th2), de acordo com o microambiente no qual são produzidas (CURFS et al., 1997; LIN et al., 2000; SOMMER; WHITE, 2010). Estudos recentes em equinos indicam que a expressão de mRNA de citocinas em potros é muitas vezes quantitativamente menor que a de cavalos adultos, sugerindo que as células T dos potros ainda não estão totalmente maduras para esta função (MEALEY et al., 2007; SHEORAN et al., 2000; WAGNER et al., 2010). Em bovinos, os neonatos são deficientes na resposta Th1, porém após a ingestão do colostro adquirem um perfil imunológico Th1 que se mantém até completarem 15 dias de vida, quando as citocinas não são mais detectáveis (MADUREIRA, 2011; YAMANAKA et al., 2003).

Os antígenos-ativados naturais das células T CD4⁺ podem se diferenciar em várias linhagens de células T efetoras, incluindo as células T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper folicular (Tfh), T helper 9 (Th9), T helper 17 (Th17), assim como várias subpopulações de células T regulatórias incluindo células T regulatórias naturais FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ (nTreg), células T regulatórias induzidas FOXP3⁺ ou FOXP3⁻ (iTreg), incluindo as células T regulatórias tipo 1 (Tr1) e células T helper tipo 3 (Th3) (CHEN et al., 2010).

Como não é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto a sua função biológica, elas foram agrupadas em interleucinas (IL, numeradas sequencialmente de IL-1 a IL-35), fator de necrose tumoral (TNF),

quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal (RAEBURN et al., 2002; SOMMER; WHITE, 2010).

2.2 Fator de necrose tumoral (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina usualmente presente na resposta imunológica mediada por células, assim descrita com base em estudos realizados em camundongos (GENOV; SOLÉ, 2007). Conhecido como caquexina, sendo uma citocina pró- inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T, sendo abundantes no peritônio e no tecido esplâncnico (OLIVEIRA et al., 2011).

Estudos imunológicos desenvolvidos em modelos murinos podem ser limitados por diferenças entre as espécies, desta forma não refletem o verdadeiro ambiente imunológico apresentado por algumas doenças do homem (GENOV; SOLÉ, 2007). Estudos realizados em humanos sobre a transferência de citocinas via placentária e os componentes do colostro/leite têm sugerido o papel das citocinas maternas tais como IL-1, IL-6, TNF- α , na proteção imunológica de neonatos e na modulação do desenvolvimento do sistema imune neonatal, durante a colonização de bactérias comensais (BOCCI et al., 1993). No entanto, a maioria desses estudos não avaliou os múltiplos tipos (Th1, Th2 e T regulatório tipo 1 [Tr1]) de citocinas de seus perfis ao longo da infância (NGUYEN-VERMILLION et al., 2006).

Após procedimento cirúrgico, trauma ou durante as infecções, o TNF- α é considerado um dos mediadores mais precoces e potentes da resposta inflamatória. Embora sua meia vida plasmática seja de 20 minutos, é suficiente para provocar mudanças metabólicas e hemodinâmicas importantes e ativar outras citocinas distantes (CURFS et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2011 RAEBURN et al., 2002).

2.3 Interleucina-2 (IL-2)

É uma proteína de 15 kDa produzida principalmente por células T-CD4 e em menor quantidade por células T-CD8 (OLIVEIRA et al., 2011). Induz a produção de outras citocinas como, por exemplo, IFN- γ e TNF- α , resultando na ativação de monócitos, neutrófilos e células “natural killer” (NK). Desse modo, fica evidente que a IL-2 contribui para a geração e propagação de respostas imunológicas específicas ao antígeno (CURFS et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2011; RAEBURN et al., 2002). Tem sido estudada sua aplicação clínica, na terapia oncológica, imunodeficiência e rejeição de transplantes (CHAVEZ et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). É a principal citocina responsável por ativar a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células T maduras periféricas depois se tornarem ativadas pelo antígeno (OLIVEIRA et al., 2011).

Atua nas células B tanto como um fator de crescimento quanto como um estímulo para síntese de anticorpos. Esta função foi demonstrada *in vitro*. (ABBAS et al., 2009). Após a administração subcutânea ocorre a absorção em 1 hora, seguida por excreção renal, de modo que as concentrações plasmáticas máximas ocorrem entre 2 a 3 horas e são detectáveis ainda após 12 a 16 horas da aplicação. Os sinais cardinais da inflamação (ou seja, rubor, calor, dor e tumor) são devidos à ação da IL-2, a ativação de células NK e células T, que em seguida, produz citocinas pró-inflamatórias, levando ao extravasamento de plasma e células no local da aplicação de IL-2 (SMITH, 2003).

2.4 Interleucina-4 (IL-4)

É uma proteína de 15 kDa, com propriedade anti-inflamatória e produzida por linfócitos T-CD4, mastócitos, eosinófilos e basófilos. Tem ação sobre linfócitos T e B, células NK, mastócitos, sinoviócitos e IgE, que são imunoglobulinas importantes nas respostas alérgicas e anti-helmínticas (OLIVEIRA et al., 2011).

A IL-4 juntamente com a IL-13 contribui para uma forma alternativa de ativação dos macrófagos que é distinta da resposta dos macrófagos ao IFN- γ . Os efeitos da IL-4 sobre os macrófagos incluem a indução de arginase levando à produção de colágeno, e expressão aumentada de receptor a manose, que promove a fagocitose de micro-organismos (ABBAS et al., 2009).

Tem potencial terapêutico em muitas situações clínicas, como por exemplo, em psoríase, osteoartrite, linfoma e asma (O'BYRNE, 2006; REN; ZHOU, 2009).

2.5 Interleucina-6 (IL-6)

É uma glicoproteína de 22 a 27 kDa, secretada por muitos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e da glia, sendo TNF- α e IL-1 potentes indutores; causa febre e ativa o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal, usando os receptores α (IL-6R α) e a subunidade gp 130 (glicoproteína 130) (OLIVEIRA et al., 2011; SOMMER; WHITE, 2010). É um dos mais precoces e importantes mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos, como trauma, infecção, cirurgias e queimadura (LIN et al., 2000). É considerado um marcador relevante de lesão tecidual durante um procedimento cirúrgico, em que o aumento excessivo e prolongado está associado a uma morbidade pós-operatória maior (GEBHARD et al., 2000).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia a resposta imune antígeno-específica e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda. Tem ainda ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação (HEINRICH et al., 1990; VARELLA; FORTE, 2001).

2.6 Interleucina-10 (IL-10)

É um polipeptídeo não glicosado com cerca de 18 kDa, sintetizado em células imunológicas e tecidos neuroendócrino e neural (LIN et al., 2000). Inibe as citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α , IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias (ASADULLAH et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

O efeito principal da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- β . Inibe ainda a proliferação de células Th1, mas não de Th2, diminuindo ainda a função citolítica e secretora de citocinas por Th1 e facilitando o desenvolvimento de respostas Th2. A IL-10 atua como um co-estimulador para a proliferação de mastócitos e seus progenitores (THOMPSON-SNIPES et al., 1991; VARELLA; FORTE, 2001).

2.7 Interleucina-17A (IL-17A)

Nos últimos anos, a importância da IL-17 é muitas vezes mencionada no contexto da inflamação intestinal, tanto aguda como crônica, nos pacientes humanos (FUJINO et al., 2003; MENSINKOVA et al., 2013). A IL-17 é muito importante em diversas doenças inflamatórias em várias espécies animais, mas ainda há poucos resultados sobre o papel da IL-17 nos animais de grande porte e animais de estimação (MENSINKOVA et al., 2013). Estudos descobriram que as células T CD4 + TH17 produtoras de IL-17 foram responsáveis pela inflamação em dois modelos de doença autoimune em ratos, a encefalomielite autoimune experimental e a artrite induzida (DONG, 2006; GABR et al., 2011). Estes achados sugerem um papel potencial para as células TH17 na regulação de vários processos inflamatórios (DONG, 2006; GABR et al., 2011).

As células TH17 aparecem nos locais de inflamação com rápida cinética. Através da indução potente de quimiocinas, as células TH17 poderiam preencher a lacuna entre a imunidade inata e adaptativa e atrair outros subconjuntos de células T auxiliares para os locais de infecção na fase posterior do processo inflamatório. Além TH17 produzir IL-17A, também produz

IL-17F e estas tem funções de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α e IL-1 β), quimiocinas e metaloproteinases para vários tecidos e tipos celulares, ou seja, induzindo inflamação e o recrutamento de neutrófilos (BETTELLI et al., 2008)

2.8 Interferon gama (IFN- γ)

O IFN- γ tem atividade anti-viral e anti-parasitária, mas sua principal atividade é imunomoduladora. Entre as principais atividades do IFN- γ encontram-se a inibição da proliferação de células que sintetizam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e a diminuição da produção de algumas imunoglobulinas em situações especiais, como IgG 1, IgG 4 e IgE (VARELLA; FORTE, 2001).

As funções do IFN- γ são importantes na imunidade mediada por células contra micro-organismos intracelulares. As subclasses de IgG induzidas pelo IFN- γ se ligam a receptores Fc γ nos fagócitos e ativam o complemento, e esses dois mecanismos promovem a fagocitose de micro-organismos opsonizados. Assim, o IFN- γ induz respostas de anticorpos que também participam na eliminação de micro-organismos medida por fagocitose, de comum acordo com os efeitos diretos de ativação dos macrófagos exercidos por esta citocina (ABBAS et al., 2009).

A presença de IFN- γ é esperada na evolução normal da ferida, induzindo sua remodelação pela expressão de collagenase (DANS et al., 1994; DE VITTA et al., 2006; TAMAI et al., 1995). Entretanto, concentrações elevadas de IFN- γ inibem a fase proliferativa da cicatrização de feridas pela diminuição do acúmulo de colágeno e causando enfraquecimento da tensão da ferida (CORNELISSEN et al., 2000; ISHIDA, et al., 2004; SHEN et al., 2012).

Desta forma, os objetivos deste estudo foram:

- Determinar qual o perfil da resposta imunológica (Th1 ou Th2) que os bezerros portadores de hérnias umbilicais apresentam antes e após a correção cirúrgica, por meio das variações das concentrações das citocinas: TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A e IFN- γ .

- Estabelecer intervalo de referência para estas citocinas no plasma e no líquido peritoneal de bezerros antes e após a herniorrafia.

III. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Vinte bezerros, raça Holandesa, idade variando entre 45 dias a 8 meses, machos e fêmeas, foram distribuídos em 2 grupos: controle (animais sem alteração na região umbilical, n=10) e experimental (animais portadores de hérnias umbilicais, n=10). Todos os animais foram vermifugados com albendazol¹ por via subcutânea, mantidos em pasto de “tifton”, receberam água *ad libitum* e concentrado (ração comercial). Animais lactentes receberam leite por meio de mamadeira. Os animais incluídos neste estudo foram avaliados clinicamente e somente bezerros com valores normais de hemograma foram incluídos neste estudo. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) local.

3.2 Delineamento experimental

Os animais sadios e com hérnia umbilical provenientes de 6 propriedades diferentes da região de Araçatuba-SP e retornaram às propriedades de origem após o término deste estudo. Todos os animais foram submetidos a exame físico, sedação e colheita do sangue e do líquido peritoneal no período da manhã. Nos animais com hérnia, as colheitas foram realizadas no momento 0 (realizado imediatamente anterior à cirurgia), 1, 3, 5, 7 e 15 dias após a cirurgia (Figura 1). Estes momentos de colheita foram coincidentes para os animais do grupo controle (não portadores de hérnia umbilical) com a mesma manipulação realizada no grupo experimental, no entanto sem a realização do procedimento cirúrgico (Figura 2).

¹Agendazol a 15%, Agener União, São Paulo, SP, Brasil.

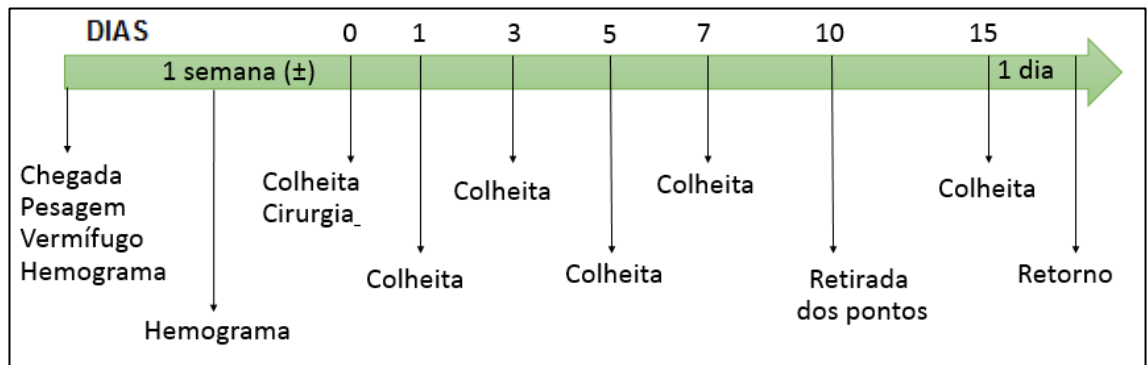


FIGURA 1 – Esquema representando os momentos experimentais nos animais do grupo experimental (animais com hérnia umbilical submetido ao procedimento cirúrgico).

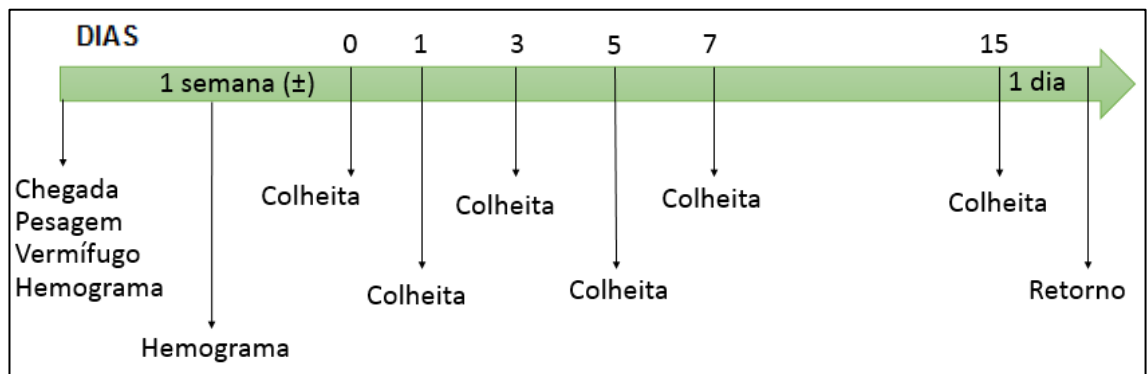


FIGURA 2 – Esquema representando os momentos experimentais nos animais do grupo controle (animais sadios não submetidos ao procedimento cirúrgico).

Apenas nos animais que passaram por procedimento cirúrgico (grupo experimental) foi realizado curativo diário com polivinil pirrolidona iodo², repelente e ducha de água durante 20 minutos, além de antibioticoterapia com oxitetraciclina de longa duração³ a cada 48 horas por via intramuscular, no total de 5 aplicações. Os pontos foram removidos no décimo dia do pós-operatório.

Imediatamente após as colheitas, as amostras de líquido peritoneal e de sangue colhidas em tubos contendo citrato de sódio⁴ foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante do líquido peritoneal e o

²Antisséptico Riodeine Tópico 10% (PVPI), Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

³Terramicina LA 20%, Pfizer Ltda, Campinas, SP, Brasil.

⁴Tubo citrato de Sódio 3,2%, Labor Import, Osasco, SP, Brasil.

plasma foram aliquotados em tubos de polipropileno⁵ de 1,5 mL e congelados a -80°C até o momento de quantificação das citocinas. As amostras de sangue colhidas em tubos a vácuo contendo EDTA⁶ foram homogeneizadas e utilizadas para realização de hemograma em um contador automático de células⁷.

3.3 Amostras

3.3.1 Sangue

O sangue foi colhido, em duplicata, em tubos a vácuo contendo EDTA⁶, para a realização do hemograma de cada animal por meio de um contador automático de células⁷, e citrato de sódio⁴ para a análise das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-17A. As colheitas ocorreram no momento 0 (imediatamente anterior à cirurgia), 1, 3, 5, 7 e 15 dias após a cirurgia. Estes momentos de colheita foram coincidentes para os animais do grupo controle (não portadores de hérnia umbilical).

3.3.2 Líquido peritoneal

O líquido peritoneal foi colhido de acordo com a técnica de Burton et al. (1997) e Peiró et al. (2009) e transferido para tubos contendo citrato de sódio⁴, a fim de se efetuar a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-17A. As colheitas ocorreram nos momentos 0 (imediatamente anterior à cirurgia), 1, 3, 5, 7 e 15 dias após a cirurgia. Estes momentos de colheita foram coincidentes para os animais do grupo controle (não portadores de hérnia umbilical).

Os bezerros foram sedados com diazepam⁸ (0,05 mg/kg de peso vivo, IV) e xilazina⁹ (0,05 mg/kg peso vivo, IM), e posicionados em decúbito lateral

⁵MCT-150-C, Axygen, Corning, Nova York, EUA.

⁶Vacutainer, BD, Plymouth, Reino Unido.

⁷BC-2800Vet, Mindray, Shenzhen, Guangdong, China.

⁸Compaz, Cristália, Itapira, SP, Brasil.

esquerdo com o membro pélvico direito abduzido dorsal e caudalmente. Os pêlos foram tricotomizados sobre uma área de aproximadamente 15 cm de diâmetro dorsal e caudal ao umbigo e em um segundo ponto localizado no centro da região inguinal (10 cm caudal à cicatriz umbilical e 10 cm lateralmente em direção à região inguinal). A pele em ambos os locais foi preparada assepticamente com polivinil pirrolidona iodo². No primeiro ponto para a realização da abdominocentese (oposto à cicatriz umbilical, quatro a cinco cm dorso- lateral a partir da linha branca) foi inserida uma agulha 14G x 59 mm penetrando inicialmente o subcutâneo e finalmente a cavidade abdominal, em sentido caudal à cicatriz umbilical, mantendo a agulha paralela à parede abdominal para evitar perfuração de alças intestinais ou órgãos abdominais. Um cateter de poliestireno¹⁰ (30,4 cm de comprimento) foi passado pelo interior da agulha e uma seringa estéril de 20 mL foi acoplada ao cateter para permitir a aspiração do líquido peritoneal. O cateter foi movido delicadamente, em seu comprimento total e em todas as direções (dorsal, caudal ou ventralmente), enquanto o êmbolo foi tracionado, dentro da cavidade abdominal para maximizar a colheita do líquido peritoneal. Quando a amostra no primeiro local foi de volume inadequado ou não permitiu a colheita do líquido peritoneal, foi realizada nova tentativa de colheita no centro da região inguinal, utilizando-se a mesma técnica descrita anteriormente. O líquido peritoneal foi transferido para tubos contendo citrato de sódio⁴. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 minutos e transferidas para tubos de polipropileno⁵ (1,5 mL) sendo congeladas a -80°C até o momento da quantificação.

3.4 Procedimento Cirúrgico

Os bezerros foram sedados com diazepam⁸ (0,05 mg/kg de peso vivo, IV) e xilazina⁹ (0,05 mg/kg peso vivo, IM), e posicionados em decúbito dorsal.

⁹Coopazine, Coopers, Cotia, SP, Brasil.

¹⁰I-Cath, Becton-Dickinson Ltd., Juiz de Fora, MG, Brasil.

O pêlo foi tricotomizado sobre uma área de aproximadamente 15 cm de diâmetro dorsal e caudal ao umbigo. A pele e a parede abdominal próxima ao anel herniário foram infiltradas com lidocaína a 2%¹¹. Após a antissepsia da pele com polivinil pirrolidona iodo², uma incisão fusiforme da base do umbigo foi realizada na pele e tecido subcutâneo com bisturi. A cavidade abdominal foi aberta por meio de uma incisão sobre a linha branca imediatamente cranial à base do saco herniário e a exploração da cavidade abdominal foi feita pela palpação digital cuidadosa para verificar possíveis aderências de órgãos abdominais ao anel ou ao saco herniário. Em seguida, procedeu-se a ressecção do saco herniário em toda a sua extensão com o auxílio de uma tesoura curva de Metzenbaum de pontas rombas. O anel herniário foi suturado no padrão sultan com fio inabsorvível de poliéster trançado com cobertura número 2 agulhado¹². O tecido subcutâneo foi aproximado com fio absorvível de poliglactina 910 2-0 agulhado¹³ no padrão Cushing. Finalmente, a sutura de pele foi realizada com fio de náilon 2-0 agulhado¹⁴ no padrão Wolf.

3.5. Determinação das concentrações de citocinas plasmáticas e no líquido peritoneal por citometria de fluxo (CBA)

As concentrações de TNF- α , IL-2 e IFN- γ (Th1); IL-4, IL-6, IL-10 (Th2) e IL-17A foram mensuradas nas amostras plasmáticas dos bezerros, e também no líquido peritoneal, pelo método Cytometric Bead Array (CBA), que emprega uma mistura de seis esferas de poliestireno de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para o painel de citocinas humanas. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio, empregando volumes pequenos de amostra. Brevemente, alíquotas de 25 μ L de líquido peritoneal e de plasma, alíquotas de 25 μ L dos padrões de citocinas submetidas à diluição seriada com diluente

¹¹Lidovet, Bravet Ltd., Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

¹²Ethibond Excel, Johnson & Johnson Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil.

¹³Vicryl II, Johnson & Johnson Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil.

¹⁴Mononylon, Jonson & Jonson Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil.

(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 µL de diluente apenas (controle negativo) foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL. Em seguida, em cada tubo foram adicionados 15 µL da mistura de esferas de captura conjugadas com anticorpos monoclonais anti-TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ , com subsequente incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a 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 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 fluxo¹⁵. A aquisição dos dados (2500 eventos) foi realizada a 488 nm. Os resultados foram expressos como medianas da concentração de citocinas (pg/mL).

3.6. Análise estatística

Todos os dados foram comparados entre bezerros portadores ou não de hérnias umbilicais em um período de 15 dias para se excluir a possibilidade do efeito de paracenteses seriadas no líquido peritoneal. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas entre os momentos estudados¹⁶. A quantificação das citocinas no plasma e no líquido peritoneal foi realizada através do software¹⁷ desenvolvido pelo fabricante. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Friedman. As

¹⁵Accuri C6, BD, San Jose, Califórnia, EUA.

¹⁶SAS- SPSS STATISTIC versão 22.0, 2013

¹⁷FCAP ARRAY v3, versão 3.0.19.2091, BD, San Jose, Califórnia, EUA

diferenças entre os valores das medianas ao longo do tempo dentro de cada grupo foram comparadas pelo teste de Dunn. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para se comparar os grupos no mesmo momento. Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança). Os testes foram considerados significantes quando o valor de $P < 0,05$.

IV. RESULTADOS

Procedimento cirúrgico: Não houve complicações durante a herniorrafia, nem durante o pós-operatório de todos bezerros do grupo experimental.

A incisão realizada na linha branca variou de 4 a 8 cm de extensão, e os bezerros não tiveram infecção antes ou depois da herniorrafia.

Achados no líquido peritoneal: Não foram encontradas alterações ($p>0,05$) nas concentrações de citocinas no líquido peritoneal durante os momentos avaliados nem no grupo experimental e nem no controle.

Achados no plasma: Antes da cirurgia (momento 0), as concentrações plasmáticas de TNF- α já se encontravam aumentadas nos animais portadores de hérnias umbilicais em relação aos animais do grupo controle (Tabela 1). Em comparação com os valores basais da concentração plasmática de citocinas em bezerros portadores de hérnias umbilicais, aumentos significativos de IL-4 (Tabela 6) e IL-10 (Tabela 7) foram detectados 24 horas após a cirurgia. Após 7 dias do pós-operatório somente foi detectado aumento das concentrações plasmáticas de IL-10 (Tabela 7) no grupo experimental. Em bezerros do grupo controle, não ocorreu alteração nas concentrações plasmáticas das citocinas nos momentos avaliados.

Os valores das concentrações plasmáticas e do líquido peritoneal das citocinas TNF- α , IL-2, IL-6, IFN- γ , IL-17A, IL-4 e IL-10 nos grupos estudados estão descritos nas Tabelas de 1 a 7, respectivamente.

A representação gráfica das concentrações plasmáticas de citocinas humanas (TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A e IFN- γ) e os deslocamentos dos respectivos “clusters” nos momentos avaliados (0, 1, 3, 5, 7 e 15 dias) no grupo controle e no experimental, além do controle de qualidade demonstrando os sete picos individuais de cada citocina, estão representados nas Figuras 3 e 4.

Foi realizado “blast”¹⁸ (comparação das sequências de aminoácidos) entre as citocinas humanas e as da espécie bovina (*Bos taurus*) observando-se a seguinte homologia: 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).

¹⁸http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Tabela 1 – Concentrações de TNF- α em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em momentos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança)

Variável (pg/mL)	Momentos (dias)	Plasma		Líquido Peritoneal	
		Grupo Experimental (n=10)	Grupo Controle (n=7)	Grupo Experimental (n=9)	Grupo Controle (n=8)
TNF- α	0	0,71 A (0-1,88)	0,00 B (0-1,43)	0,00 (0-0,83)	0,07 (0-0,68)
	1	0,23 (0-3,53)	0,20 (0-1,84)	0,00 (0-2,47)	0,19 (0-2,06)
	3	0,37 (0-1,35)	0,41 (0-3,34)	0,00 (0-0,46)	0,53 (0-1,46)
	5	0,53 (0-2,18)	1,20 (0-2,19)	0,34 (0-1,72)	0,63 (0-1,56)
	7	0,13 (0-1,66)	0,12 (0-2,1)	0,00 (0-0,53)	0,31 (0-1,82)
	15	0,47 (0-1,53)	0,00 (0-0,8)	0,34 (0-1,23)	0,39 (0-1,39)

Medianas seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si ($p < 0,05$). Ausência de letras nas colunas indica que não existe diferença significativa entre os momentos ($p > 0,05$).

Tabela 2 – Concentrações de IL-2 em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em momentos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança)

Variável (pg/mL)	Momentos (dias)	Plasma		Líquido Peritoneal	
		Grupo Experimental (n=10)	Grupo Controle (n=7)	Grupo Experimental (n=9)	Grupo Controle (n=8)
IL-2	0	0,95 (0-2,39)	0,00 (0-1,81)	0,00 (0-1,47)	0,31 (0-0,99)
	1	0,51 (0-3,42)	0,49 (0-1,35)	0,00 (0-1,57)	0,17 (0-1,49)
	3	0,97 (0-1,49)	0,61 (0-1,96)	0,92 (0-1,63)	0,46 (0-2,07)
	5	0,39 (0-2,55)	0,34 (0-1,75)	0,00 (0-1,81)	0,44 (0-2,18)
	7	0,62 (0-2,12)	0,49 (0-1,35)	0,00 (0-1,15)	0,86 (0-1,72)
	15	0,84 (0-2,03)	0,00 (0-0,84)	0,10 (0-1,72)	0,71 (0-1,43)

Ausência de letras nas linhas indica que não existe diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Ausência de letras nas colunas indica que não existe diferença significativa entre os momentos ($p > 0,05$).

Tabela 3 – Concentrações de IL-6 em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em momentos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança)

Variável (pg/mL)	Momentos (dias)	Plasma		Líquido Peritoneal	
		Grupo Experimental (n=10)	Grupo Controle (n=7)	Grupo Experimental (n=9)	Grupo Controle (n=8)
IL-6	0	1,58 (0-2,04)	0,00 (0-2,64)	0,00 (0-1,36)	0,00 (0-1,58)
	1	1,34 (0-3,98)	0,00 (0-2,3)	0,00 (0-1,33)	0,38 (0-0,68)
	3	0,62 (0-2,81)	0,00 (0-3,13)	0,00 (0-1,79)	1,06 (0-1,84)
	5	1,37 (0-2,53)	0,99 (0-2,35)	0,00 (0-1,46)	0,38 (0-1,67)
	7	0,65 (0-2,61)	0,00 (0-2,37)	0,00 (0-1,98)	0,94 (0-1,07)
	15	1,30 (0-2,96)	0,00 (0-1,62)	0,67 (0-1,46)	0,63 (0-1,67)

Ausência de letras nas linhas indica que não existe diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Ausência de letras nas colunas indica que não existe diferença significativa entre os momentos ($p > 0,05$).

Tabela 4 – Concentrações de IFN- γ em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em momentos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança)

Variável (pg/mL)	Momentos (dias)	Plasma		Líquido Peritoneal	
		Grupo Experimental (n=10)	Grupo Controle (n=7)	Grupo Experimental (n=9)	Grupo Controle (n=8)
IFN- γ	0	1,93 (0-6,02)	0,00 (0-3,6)	0,00 (0-5,18)	0,00 (0-2,8)
	1	1,75 (0-8,91)	0,00 (0-1,83)	0,00 (0-1,88)	1,99 (0-2,49)
	3	0,00 (0-4,64)	0,00 (0-3,45)	1,23 (0-4,67)	0,70 (0-3,45)
	5	1,70 (0-6,4)	1,58 (0-4,47)	0,00 (0-4,01)	0,00 (0-3,65)
	7	0,46 (0-3,95)	0,00 (0-3,17)	0,77 (0-3,38)	0,70 (0-2,33)
	15	1,08 (0-3,59)	0,33 (0-3,6)	0,00 (0-3,38)	2,25 (0-2,33)

Ausência de letras nas linhas indica que não existe diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Ausência de letras nas colunas indica que não existe diferença significativa entre os momentos ($p > 0,05$).

Tabela 5 – Concentrações de IL-17A em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em momentos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança)

Variável (pg/mL)	Momentos (dias)	Plasma		Líquido Peritoneal	
		Grupo Experimental (n=10)	Grupo Controle (n=7)	Grupo Experimental (n=9)	Grupo Controle (n=8)
IL-17A	0	2,37 (0-10,45)	0,00 (0-11,94)	0,00 (0-12,82)	0,00 (0-6,36)
	1	0,85 (0-34,4)	0,00 (0-6,17)	0,00 (0-0,26)	0,00 (0-10,72)
	3	0,02 (0-10,1)	4,79 (0-20,65)	0,00 (0-8,97)	0,00 (0-12,27)
	5	0,00 (0-34,1)	0,00 (0-24,13)	0,00 (0-9,27)	0,00 (0-7,9)
	7	1,41 (0-11,5)	0,04 (0-10,1)	0,00 (0-9,27)	0,78 (0-10,98)
	15	0,00 (0-10,45)	0,00 (0-18,64)	0,00 (0-7,13)	0,00 (0-9,18)

Ausência de letras nas linhas indica que não existe diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Ausência de letras nas colunas indica que não existe diferença significativa entre os momentos ($p > 0,05$).

Tabela 6 – Concentrações de IL-4 em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em momentos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança)

Variável (pg/mL)	Momentos (dias)	Plasma		Líquido Peritoneal	
		Grupo Experimental (n=10)	Grupo Controle (n=7)	Grupo Experimental (n=9)	Grupo Controle (n=8)
IL-4	0	0,42 (0-1,58)	0,00 (0-1,14)	0,00 (0-0,83)	0,15 (0-1,03)
	1	0,65 A (0-2,58)	0,00 B (0-0,88)	0,00 (0-0,51)	0,00 (0-1,65)
	3	0,96 (0-1,56)	0,00 (0-1,98)	0,00 (0-1,32)	0,87 (0-2,04)
	5	0,78 (0-2,07)	0,00 (0-1,36)	0,00 (0-1,86)	0,39 (0-0,86)
	7	0,92 (0-1,68)	0,00 (0-0,83)	0,00 (0-0,83)	0,77 (0-1,35)
	15	0,19 (0-1,96)	0,81 (0-1,07)	0,24 (0-1,15)	0,55 (0-1,44)

Medianas seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si ($p < 0,05$). Ausência de letras nas colunas e linhas indica que não existe diferença significativa entre os momentos e os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 7 – Concentrações de IL-10 em amostras plasmáticas e de líquido peritoneal obtidas de bezerros da raça Holandesa sem hérnia (Grupo Controle) e com hérnias umbilicais (Grupo Experimental), antes (basal) e em momentos (dias) após a herniorrafia realizada no dia 0 (momento 0). Os dados são apresentados como mediana (intervalo de confiança)

Variável (pg/mL)	Momentos (dias)	Plasma		Líquido Peritoneal	
		Grupo Experimental (n=10)	Grupo Controle (n=7)	Grupo Experimental (n=9)	Grupo Controle (n=8)
IL-10	0	0,71 (0-1,91)	0,00 (0-3,31)	0,69 (0-2,2)	1,21 (0-2,27)
	1	1,60 A (0-4,4)	0,00 B (0-1,56)	0,88 (0-2,06)	0,00 (0-2,24)
	3	0,87 (0-2,39)	0,00 (0-3,82)	0,44 (0-2,4)	1,39 (0-1,96)
	5	1,27 (0-3,87)	0,29 (0-2,95)	0,00 (0-2,83)	0,66 (0-1,81)
	7	1,06 A (0-2,39)	0,00 B (0-0,69)	0,00 (0-1,71)	0,33 (0-1,81)
	15	0,32 (0-2,58)	0,00 (0-1,56)	0,00 (0-1,69)	0,00 (0-2,03)

Medianas seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si ($p < 0,05$). Ausência de letras nas colunas indica que não existe diferença significativa entre os momentos ($p > 0,05$).

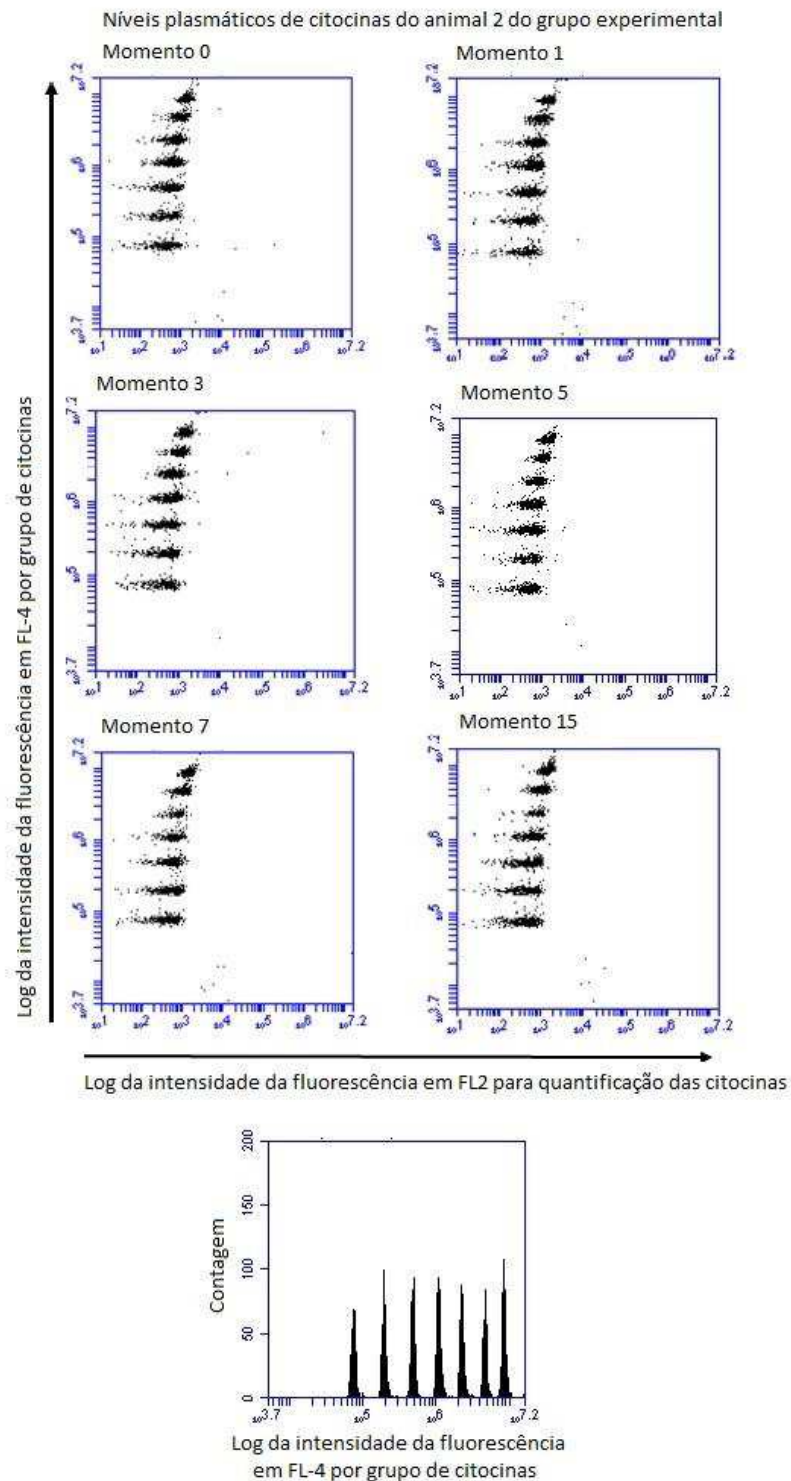


FIGURA 3 – Gráfico representativo usado em citometria de fluxo das concentrações plasmáticas de citocinas do animal 2 do grupo experimental, demonstrando os sete picos individuais para cada citocina humana (TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A e IFN- γ) e os deslocamentos dos “clusters” nos momentos avaliados (0, 1, 3, 5, 7 e 15 dias).

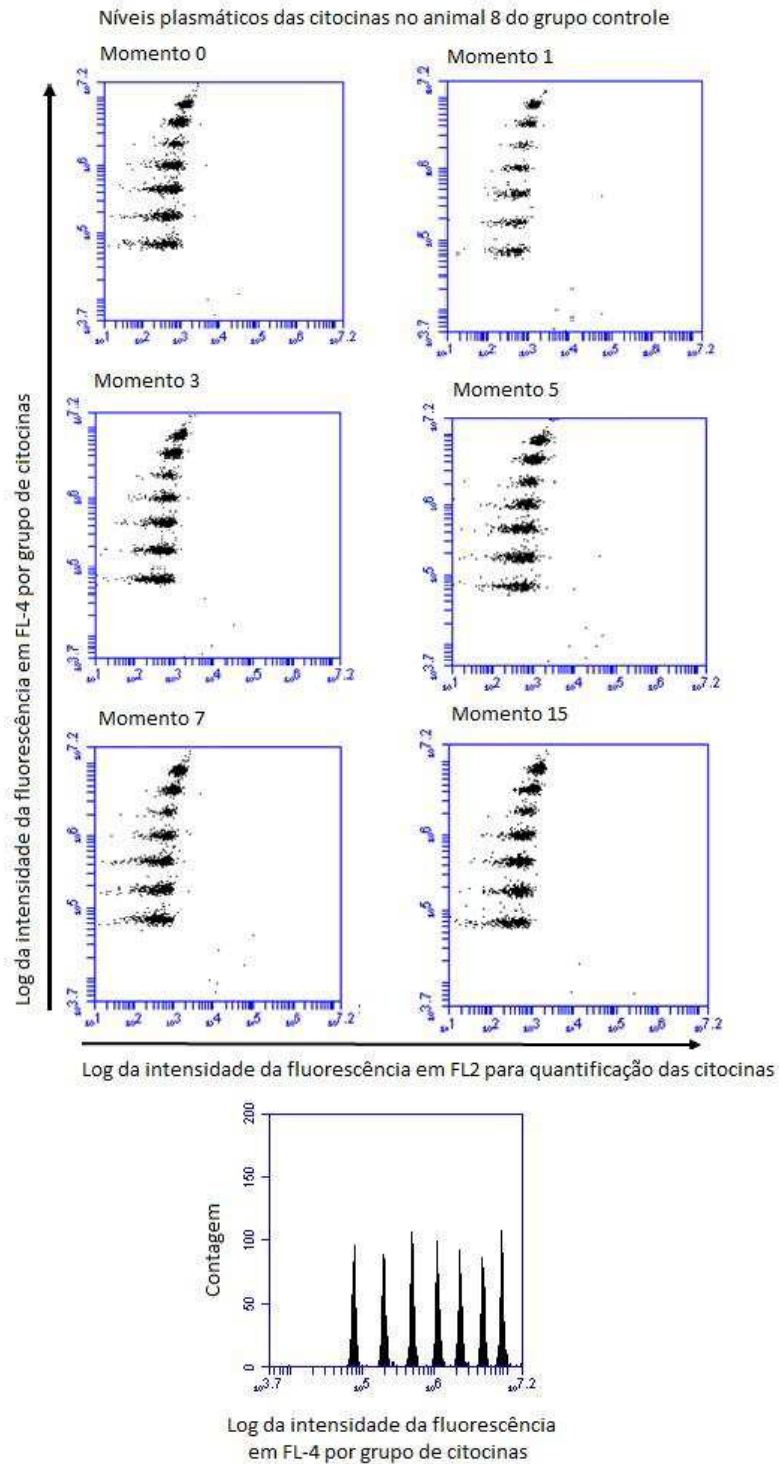


FIGURA 4 – Gráfico representativo usado em citometria de fluxo das concentrações plasmáticas de citocinas do animal 8 do grupo controle, demonstrando os sete picos individuais para cada citocina humana (TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A e IFN- γ) e os deslocamentos dos “clusters” nos momentos avaliados (0, 1, 3, 5, 7 e 15 dias).

V. DISCUSSÃO

Em recém-nascidos de pacientes humanos com hérnia diafragmática congênita demonstraram concentrações séricas elevadas de IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10 e TNF- α com ausência de encarceramento de alça de intestinal, quando comparadas com recém-nascidos saudáveis, indicando que estas alterações estariam associadas a uma resposta inflamatória sistêmica imediatamente após o nascimento (SCHAIBLE et al., 2011). No presente estudo, a presença da hérnia umbilical alterou somente as concentrações plasmáticas de TNF- α , indicando que esta citocina nos bezerros pode ser a principal citocina envolvida com o padrão de resposta inflamatória aguda, e que esta inflamação local pode ter um papel importante na modulação e na correlação entre a presença da hérnia com o aumento de TNF- α . Esta citocina é produzida pelos macrófagos e monócitos durante a fase de inflamação aguda (CHEN; THIBEAULT, 2010; UENO et al., 2006). Entretanto, a ausência das outras citocinas confirma a hipótese de que durante o período de imaturidade dos bezerros este é incapaz de secretar citocinas identificado através da ausência destas na circulação imediatamente após o nascimento (MADUREIRA, 2011; YAMANAKA et al., 2003).

Após uma cirurgia abdominal, a resposta intraperitoneal durante o pós-operatório é muito maior do que a resposta sistêmica (JANSSON et al., 2004; SCHEINGRABER et al., 2001). Este achado reforça a importância da coleta do líquido peritoneal, pois a cavidade abdominal é o primeiro compartimento no qual se observa elevação mais rápida e mais elevada das concentrações de citocinas determinando uma reação inflamatória pós-operatória (JANSSON et al., 2004).

Esta resposta inflamatória inicial no líquido peritoneal é caracterizada por aumentos nas concentrações de IL-6, TNF- α e IL-1a (BAKER et al., 2003; DE VITA et al., 2006) 24 horas após cirurgia eletiva de câncer coloretal em humanos. Em casos de complicações como peritonite asséptica, esta resposta

resultará em aumentos significativos de citocinas compartmentalizadas na cavidade peritoneal (JANSSON et al., 2004; SCHEIN et al., 1996), enquanto em casos de peritonite séptica, como a síndrome da peritonite causada por mecônio em neonatos humanos, leva a um aumento significativo de IL-6 e IL-8 tanto no líquido peritoneal quanto sistemicamente (KANAMORI et al., 2012). Assim, nossos resultados demonstram que a herniorrafia realizada foi asséptica justificando uma não alteração nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias do líquido peritoneal em nenhum dos momentos, diferentemente de casos de câncer coloretal em humanos, onde se faz necessária a realização de enterectomia e enteroanastomose.

Em estudos que avaliaram a resposta inflamatória em cirurgias eletivas em pacientes humanos, observou-se que as concentrações plasmáticas de IL-6 refletem o dano tecidual resultante da extensão do trauma cirúrgico (GEBHARD et al., 2000; GLASSER et al., 1995; ISHIBASHI et al., 2006; KOTANI et al., 1996). Após uma laparotomia, há uma elevação nas concentrações séricas de IL-6 em humanos adultos (ISHIBASHI et al., 2006; ONO et al., 1999) (maior de 100 vezes) e em crianças entre 5 e 18 meses de idade (NGUYEN-VERMILION et al., 2007), demonstrando que o comprimento da incisão possui influência no estresse cirúrgico (ISHIBASHI et al., 2006; TSUKADA et al., 1993). No presente estudo, a incisão abdominal para realização da herniorrafia foi pequena (4 a 8 cm), quando comparado com cirurgia de laparotomia, onde a extensão cirúrgica é maior.

A concentração plasmática de IL-6 tem início variável e pode ser correlacionadas ao grau de lesão tecidual, e também é capaz de diferenciar um trauma pequeno de um maior (GEBHARD et al., 2000), devendo ser considerada um fator importante para definição dos passos iniciais para o tratamento de um trauma cirúrgico (GEBHARD et al., 2000). Complicações no pós-operatório estão associadas com aumento nos concentrações sistêmicos de IL-6 (JANSSON et al., 2004; WORTEL et al., 1993) e TNF- α no líquido peritoneal (JANSSON et al., 2004; VAN BERGE HENEGOUWEN et al., 1998). Em cavalos com cólica, observa-se aumentos nos concentrações séricas e no

líquido peritoneal de IL-6 (BARTON; COLLATOS, 1999) e TNF- α (MORRIS et al., 1991), os quais estão correlacionados com lesões estrangulativas, inflamatórias das alças intestinais (BARTON; COLLATOS, 1999) e isquemia de alça intestinal; sendo esta presença simultânea de TNF e IL-6 associada a uma condição clínica desfavorável (BARTON; COLLATOS, 1999; STEVERINK et al., 1995). Contudo, no presente estudo, não houve alteração significativa nas concentrações de IL-6 em nenhum dos compartimentos avaliados, uma vez que os animais operados não apresentaram encarceramento e nem estrangulamento de alças intestinais no saco herniário, ou seja, esta ausência de complicações pré- e pós-operatórias (líquido peritoneal com aspecto normal) demonstram que as concentrações diminuídas de citocinas caracterizam um pós-operatório normal sem complicações (JANSONN et al., 2004) com preservação da integridade do peritônio e da mucosa intestinal (LUK et al., 2009; MOEHRLEN et al., 2012).

As concentrações de IL-6 apresentam uma elevação entre 1 hora e meia (JANSONN et al., 2004; SHENKIN et al., 1989) a 6 horas a partir do início da cirurgia. Em cirurgia de toracotomia em cães observaram que houve um pico de 1 a 3 dias do pós-operatório, porém eram animais que apresentavam infecções torácicas e mediastinite (CHU et al., 2103). Em procedimentos menos invasivos, como a laparoscopia, as concentrações de IL-6 diminuem até 24 horas após a cirurgia (ISHIBASHI et al., 2006). Como em suínos, não demonstrou nenhuma diferença significativa nas concentrações séricas de TNF- α e IL-6 às 48 horas após a cirurgia de laparoscopia (FAN et al., 2009). Portanto, há um constante declínio nas concentrações de IL-6 após a sua elevação no período pós-operatório (GEBHARD et al., 2000), concordando com os resultados desta pesquisa, pois as concentrações de IL-6 detectadas 24 horas após a herniorrafia encontravam-se em seus valores basais. Outra explicação para não encontrarmos alterações nas concentrações peritoneais de IL-6 é que não é possível coletar o líquido peritoneal nos momentos descritos (até 3 horas após a cirurgia) em camundongos (ISHIBASHI et al., 2006) e humanos (GEBHARD et al., 2000), pois bezerros possuem pequena

quantidade de líquido peritoneal na cavidade abdominal, sendo necessário aguardar 24 horas para realizar nova coleta, perdendo desta forma o pico de produção desta citocina.

Também não foram encontradas alterações nas concentrações séricas de IL-1 β e TNF- α em camundongos após laparotomia, resultados que foram associados a uma não detecção pelos kits utilizados, pois a concentração destas citocinas estava abaixo do limite do teste (ISHIBASHI et al., 2006). No presente estudo, acreditamos que os valores baixos ou não detectados pelo teste CBA estão corretos pelos seguintes motivos: (1) os valores dos coeficientes de correlação das curvas-padrão eram de 99%; (2) o gráfico demonstrando os sete picos de “beads” para as diferentes citocinas na mesma altura confirmam que a mesma quantidade de cada “bead” foi colocada em cada amostra e por fim, (3) mesmo tendo sido utilizado um kit para detecção de citocinas para humanos, a homologia destas citocinas com a de bovinos foi próxima ou maior que 60%, garantindo a confiabilidade dos resultados (SCHEERLINCK et al., 1999). Além disso, o método de CBA pode mensurar várias citocinas ao mesmo tempo, apresentando praticidade e minimizando erros quando comparadas ao método de Elisa (TALAT et al., 2011).

Em cirurgias abdominais realizadas em humanos houve um aumento de IFN- γ produzido pelas células “natural killer” (NK) e células Th circulantes no peritônio durante a inflamação (GLICK; DOUVDEVANI, 2006), sendo a presença de IFN- γ esperada na evolução normal da ferida, induzindo sua remodelação pela expressão de collagenase (DANS; ISSEROFF, 1994; DE VITTA et al., 2006; TAMAI et al., 1995). Entretanto, concentrações elevadas de IFN- γ inibem a fase proliferativa da cicatrização de feridas pela diminuição do acúmulo de colágeno e causando enfraquecimento da tensão da ferida (CORNELISSEN et al., 2000; ISHIDA, et al., 2004; SHEN et al., 2012). As concentrações plasmáticas inalteradas de IFN- γ estão relacionadas com o funcionamento normal de células T auxiliares durante o período pré-operatório (CATA et al., 2013). Também é possível que concentrações normais de IFN- γ sejam o reflexo da polarização das células Th1 (CATA et al., 2013). Devido à

cirurgia ter sido asséptica e ter apresentado um processo inflamatório leve nos bezerros do presente estudo, acreditamos que os baixos concentrações plasmáticas e peritoneais de IFN- γ permitiram a instalação da resposta imune, levando à estimulação e à reepitelização da ferida pelo aumento da proliferação de queratinócitos, expressão do fator de crescimento, acelerando a deposição de colágeno, aumentando a angiogênese e a contração da ferida (SHEN et al., 2012). Reforça esta hipótese, o fato da ferida cirúrgica não apresentar complicações como deiscência de pontos, edema exacerbado e secreções ao longo dos 15 dias de pós-operatório.

Independente do trauma cirúrgico ser aberto ou causado por laparoscopia existe aumento das concentrações séricas de IL-10 (SILVEIRA et al., 2012) e a severidade da sepse intraperitoneal está correlacionada com elevados concentrações plasmáticas de IL-10, caracterizando um prognóstico mau (JANNSON et al., 2004; SCHEINGRABER et al., 2001), pois a persistência de concentrações elevadas desta citocina pode levar à imunossupressão prolongada aumentando a susceptibilidade às infecções (WIJK et al., 2001) e ela inibe a síntese do TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 por monócitos e macrófagos (MOURA et al., 2001). No presente estudo, o aumento nas concentrações plasmáticas de IL-10 às 24 horas após a cirurgia pode estar relacionado à modulação da reação inflamatória provocada pela herniorrafia, diminuindo a migração de PMN para a cavidade abdominal, pois foi demonstrado anteriormente em estudo semelhante (PEIRÓ et al., 2009) que ocorre uma elevação seguida de diminuição da migração de células polimorfonucleares (PMN) para a cavidade abdominal de bezerros submetidos à herniorrafia entre 1 e 7 dias após a cirurgia, na qual coincidem com os aumentos plasmáticos de IL-10 do presente estudo.

Tem sido constatado por estudos realizados em neonatos murinos e humanos que a diferenciação preferencial para Th2 se deve à baixa produção de IL-12 e IFN- γ e elevada produção de IL-4 (PELIZON et al., 2007; SATWANI et al., 2005). Uma vez que a elevação das concentrações plasmáticas de IL-4, expressa em linfócitos, suprime a produção de IL-8, e retira os receptores

solúveis do TNF- α dos seus sítios da superfície de certas células (MOURA et al., 2001), poderia ter causado a diminuição das concentrações plasmáticas de TNF- α observada em bezerros 24 horas após a realização da herniorrafia, demonstrando a diferenciação para a resposta Th2.

A IL-17A induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α e IL-1 β), quimiocinas e metaloproteinases para vários tecidos e tipos celulares, ou seja, induzindo inflamação tecidual e recrutamento de neutrófilos (BETTELLI et al., 2008). Em outro estudo (POLÓ, 2013), utilizando estes mesmos bezerros, observou-se que houve um aumento do número de neutrófilos circulantes 3 e 7 dias após a herniorrafia, sendo este aumento dos neutrófilos apenas uma variação dentro dos valores de referência para a espécie (PEIRÓ et al., 2009). Não foi possível avaliar a celularidade no líquido peritoneal destes bezerros, pois não havia volume suficiente para a quantificação de citocinas e outras proteínas de fase aguda (HMGB-1, activina-A e dímero-D). No entanto, no presente estudo, demonstrou-se que a reação inflamatória na cavidade abdominal resultante da presença da hérnia umbilical e do processo cicatricial da herniorrafia ocorreu independentemente de alterações nas concentrações de IL-17A.

É sabido que durante a gestação, a progesterona é um importante regulador da imunidade Th1/Th2/Th17 e Treg, sendo a imunidade Th2 aumentada característica durante a prenhez em vacas holandesas (MAEDA et al., 2013). As citocinas nas fêmeas bovinas adultas IL-1 β (10,5 pg/mL - 333,10 pg/mL), IL-6 (15,4 pg/mL - 192,1 pg/mL), IFN- γ (18,7 pg/mL - 271,5 pg/mL) e TNF- α (10,4 pg/mL - 462,8pg/mL) estão presentes no soro, e no colostro IL-1 β (9,2 pg/mL - 207,1 pg/mL), IL-6 (10,1 pg/mL - 111,2 pg/mL), IFN- γ (10,0 pg/mL - 184,9 pg/mL) e TNF- α (10,4 pg/mL - 184,9 pg/mL) (MADUREIRA, 2011). No entanto, o úbere saudável de vacas holandesas (ALLUWAIMI, 2004; CARNEIRO et al., 2009) apresenta um perfil Th1 de citocinas (CARNEIRO et al., 2009; SORDILLO et al., 1997). Os neonatos são deficientes na resposta Th1, porém após a ingestão do colostro adquirem um perfil imunológico Th1

que se mantem até completar 15 dias de vida, quando as citocinas não são mais detectáveis (MADUREIRA, 2011; YAMANAKA et al., 2003).

No neonato bovino saudável foram encontrados os valores médios nas concentrações plasmáticas de citocinas IL-1 β (46.900 pg/mL), IL-6 (1023 pg/mL), IFN- γ (190 pg/mL) e TNF- α (690 pg/mL) provenientes do colostro materno (MADUREIRA, 2011; YAMANAKA et al., 2003). Em crianças saudáveis, valores médios da concentração sérica de IL-6 (118 pg/mL), IL-10 (74 pg/mL), TNF- α (22,4 pg/mL) (NGUYEN-VERMILLION et al., 2011). Em humanos adultos saudáveis, IL-2 (1 pg/mL - 5,83 pg/mL), IL-4 (1 pg/mL- 4,44 pg/mL), IL-6 (1,46 pg/mL- 7,07 pg/mL), IL-10 (1 pg/mL- 4,64 pg/mL), TNF- α (1 pg/mL- 5,54 pg/mL) e IFN- γ (1 pg/mL- 5,14 pg/mL) (TALAT et al., 2011). Em cavalos saudáveis, concentrações da concentração sérica, TNF- α (0 pg/mL- 6 pg/mL), IL-6 (0 pg/mL) (BARTON; COLLATOS, 1999). Em potros saudáveis, TNF- α (0,2 pg/mL- 499,0 pg/mL) (SECOR et al., 2013). Em camundongos saudáveis, IL-6 (3.1 pg/mL- 9.9 pg/mL) (FUKUDA et al., 2013).

As concentrações plasmáticas basais das citocinas nos bezerros, não portadores de hérnia umbilical, do presente estudo demonstram que há diferença quando comparados com valores de referência de outras espécies. A IL-2 sendo 5 vezes maior e a IL-4 sendo 4 vezes maior em pacientes humanos saudáveis (TALAT et al., 2011). A IL-6 sendo 60 vezes menor do que encontrados no soro de vacas adultas saudáveis com mais de 2 lactações e no colostro 35 vezes menor (MADUREIRA, 2011), e somente 3 vezes maior que em cavalos saudáveis (BARTON; COLLATOS, 1999). O IFN- γ demonstrou valores 90 vezes menor do que os observados em vacas adultas saudáveis, no colostro sendo 60 vezes menor, em pacientes humanos saudáveis sendo 2 vezes menor (MADUREIRA, 2011). O TNF- α sendo 160 vezes menor do que em vacas saudáveis (MADUREIRA, 2011), 60 vezes maior no colostro (MADUREIRA, 2011), 2 vezes menor que em pacientes humanos saudáveis (TALAT et al., 2011), 3 vezes menor que em cavalos saudáveis (BARTON; COLLATOS, 1999), 70 vezes menor que em potros saudáveis (SECOR et al., 2013) e 3 vezes menor que em camundongos saudáveis (FUKUDA et al.,

2013). Contudo, demonstrando que as concentrações plasmáticas baixas de citocinas observadas em nosso estudo poderiam estar relacionadas a diferenças nas faixas etárias dos bezerros estudados, uma vez que 8 animais apresentavam entre 45 dias e 4 meses de idade, cuja transferência de citocinas pró-inflamatórias no colostro favoreceu o sistema imune destes neonatos antes deles estabelecerem a sua própria resposta imune adaptativa (MADUREIRA, 2011).

Portanto, quando um hospedeiro é exposto a um insulto nocivo, como em uma cirurgia, é importante determinar o equilíbrio entre as vias pró-inflamatórias (Th1) e anti-inflamatórias (Th2), pois através dessa modulação é possível determinar marcadores inflamatórios para avaliar complicações no pós-operatório (MARIK; FLEMER, 2012). Neste estudo, não observamos um perfil de resposta Th1, pois as concentrações plasmáticas e peritoneais de citocinas foram quantificadas somente 24 horas após a realização da herniorrafia, e a resposta Th1 está presente nas primeiras horas após um procedimento cirúrgico (JANNSON et al., 2004; SHENKIN et al., 1989). No entanto, conseguimos demonstrar um predomínio do perfil de resposta Th2 pelos aumentos nas concentrações plasmáticas de IL-4 e IL-10 durante o período pós-operatório de bezerros submetidos à herniorrafia.

VI. CONCLUSÃO

- Os animais portadores de hérnia umbilical antes da correção cirúrgica apresentaram uma resposta pró-inflamatória (TNF- α). Contudo, após o tratamento cirúrgico apresentaram um perfil de resposta Th2, ou seja, anti-inflamatória (IL-4 e IL-10) e de reparação tecidual.
- Com a escassez de trabalhos realizados com bezerros, sugere-se que nossos valores de concentrações de citocinas no plasma e no líquido peritoneal possam ser utilizados como intervalo de referência para a faixa etária nesta espécie.

VII. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia básica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2009. 328p.

ALLEN, D.; WHITE, N.A.; TYLER, D.E. Factors for prognostic use in equine obstructive small intestinal disease. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 189, p. 777-780, 1986.

ALLUWAIMI, A.M. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. **Research in Veterinary Science**, v. 77, p.211-222, 2004.

ANDERSON, D.E. Surgical diseases of the neonate. **In: 23º Congresso Mundial de Buiatria, Canadá, 2004.**

ANDERSON, D.E.; CONSTABLE, P.D.; ST.-JEAN, G.; HULL, B.L. Small-intestinal volvulus in cattle: 35 cases (1967-1992). **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.155, p.1923-1927, 1993.

ANDERSON, D.E.; CORNWELL, D.C.; ANDERSON, L.S.; DESROCHERS, A. Comparative analyses of peritoneal fluid from calves and adult cattle. **American Journal Veterinary Research**, v. 56, p.973-976, 1995.

ANDERSON,D.E.; CORNWELL,D.; STJEAN,G.; DESROCHERS,A.Comparison of peritoneal fluid analysis before and after exploratory celiotomy and omentopexy in cattle. **American Journal Veterinary Research**, v.55, p.1633-1637, 1994.

ASADULLAH, K.; SABAT, R.; FRIEDRICH, M. Interleukin IL-10: an important immunoregulatory cytokine with major impact on psoriasis. **Current Drug Targets – Inflammatory & Allergy**, v. 3, p.185-192, 2011.

BAHR, C.; DISTL, O. Frequency of congenital anomalies in cattle: results from the practice in comparison with literature. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 112, p.149-154, 2005.

BAKER E.A.; GADDAL, S.E.; AITKEN, D.G.; LEAPER, D.J. Growth factor profiles intraperitoneal drainage fluid following colorectal surgery: relationship to wound healing and surgery. **Wound Repair Regeneration**, v.11, p. 261-267, 2003.

BARTON, M.H; COLLATOS, C. Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. **Journal Veterinary Internal Medicine**,v.13, p.457-464, 1999.

CARNEIRO, D.M.V.F.; DOMINGUES, P.F.; VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v.39, p. 1934-1943, 2009.

CATA, J.P.; BAUER, M.; SOKARI, T.; RAMIREZ, M.F.; MASON, D.; PLAUTZ, G.; KURZ, A. Effects of surgery, general anesthesia, and perioperative epidural analgesia on the immune function of patients with non-small cell lung cancer. **Journal of Clinical Anesthesiology**, v. 25, p. 255-262, 2013.

CHAVEZ, A.R.; BUCHSER, W.; BASSE, P.H. Pharmacologic administration of interleukin- 2. Ann. N. Y. **Academic Science**., v. 1182, p. 14-27, 2009.

CHEN, X.; THIBEAULT, S.L. Role of TNF- α in wound repair in human vocal fold fibroblasts. **Laryngoscope**, v. 120, p. 1819-1825, 2010.

CHU, Y.; LIU, C.; WU, Y.; HSIEH, M.; CHEN, T.; CHAO, Y.; WU, C. Comparison of hemodynamic and inflammatory changes between transoral and transthoracic thoracoscopic surgery. **Plos One**, v. 8, p. 1-9, 2013.

CORNELISSEN, A.M.H.; MALTHA, J.C.; VON DEN HOFF, J.W.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M. Local injection of IFN-gamma reduces the number of myofibroblasts and the collagen content in palatal wounds. **Journal Dentistic Research**, v.79, p. 1782–1788, 2000.

CURFS, J.H.; MEIS, J.F.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J.A. A primer on cytokines:sources, receptors, effects, and inducers. **Clinics Microbiology Reviews**, v.10, p.742-780, 1997.

DANS, M.J.; ISSEROFF, R.J. Inhibition of collagen lattice contraction by pentoxifyline and interferon- alpha, -beta, and – gama. **Investigation Dermatology**, v. 102, p. 118-121, 1994.

DE VITA, G.; PATTI, R.; D'AGOSTINO, P.; CARUSO, G.; ARCARA, M.; BUSCEMI, S.; BONVENTRE, S.; FERLAZZO, V.; ARCOLEO, F.; CILLARI, E. Cytokines and growth factors in wound drainage fluid from patient sunder going incisional hernia repair. **Wound Repair Regeneration**, v.14, p.259-64, 2006.

DONG, C.; Diversification of T-helper- cell lineages: finding the family root of IL-17 producing cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 329-333, 2006.

FAN, J.K.M.; TONG, D.K.H.; HO, D.W.Y.; LUK, M.P.J.; LAW, W.L.; LAW, S. Systemic Inflammatory Response after Natural Orifice Translumenal Surgery: transvaginal cholecystectomy in a porcine model. **Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons**, v. 13, p. 9-13, 2009.

FUJINO,S.; ANDOH, A.; BAMBA, S.; OGAWA, A.; HATA, K.; ARAKI, Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 52, p.65-70, 2003.

FUKUDA, T.Y.; TANJI, M.M.; SILVA, S.R.; SATO, M.N.; PLAPLER, H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. **Laser Medicine Science**, v. 28, p. 1305- 1313, 2013.

GABR, M.A.; JING, L.; HELBLING, A.R.; SINCLAIR, B.S.; ALLEN, K.D. Interleukin -17 synergizes with IFN- γ or TNF- α to promote inflammatory mediator release and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human intervertebral disc cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, p. 1-7, 2011.

GEBHARD, F.; PFETSCH, H.; STEINBACH, G.; STRECKER, W.; KINZL, L.; BRÜCKNER, U.B. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? **Archive Surgery**, v.135, p.291-295, 2000.

GENOV, I.R.; SOLÉ, D. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e asma: metanálise é a saída? **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.30, p. 2-8, 2007.

GLASSER, F.; SANNWALD, G.A.; BUHR, H.J. General stress response to conventional and laparoscopic cholecystectomy. **Annals of Surgery**, v.221, p.372-380, 1995.

GREENWOOD, R.E.S.; DUGDALE, D.J. Treatment of umbilical hernias in foals with elastrator rings. **Equine Veterinary Education**, v.5, p. 113-115, 1993.

HEINRICH, P.C.; CASTELL, J.V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v. 265, p.621-636, 1990.

HERWIG, R.; GLODNY, B.; KUHLE, C.; SCHL UTER, B.; BRINKMANN, O.A.; STRASSER, H.; SENNINGER, N.; WINDE, G. Early detection of peritonitis by peritoneal cytokine measurement. **Diseases of the Colon and Rectum**, v.45, p.514-521, 2002.

ISHIBASHI, S.; TAKEUCHI, H.; FUJII, K.; SHIRAISHI, N.; ADACHI, Y.; KITANO, S. Length of laparotomy incision and surgical stress assessed by in surgery by in serum IL-6 level. **Injury**, v.37, n.3, p.247-251, 2006.

ISHIDA, Y.; KONDO, T.; TAKAYASU, T.; IWAKURA, Y.; MUKAIDA, N. The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process. **Journal Immunology**, v. 172, p.1848–55, 2004.

JANSSON, K.; REDLER, B.; TRUEDSSON, L.; MAGNUSON, A.; MATTHIESSEN, P.; ANDERSSON, M.; NORGREN, L. Cytokine response after major surgery: higher postoperative intraperitoneal versus systemic cytokine levels suggest the gastrointestinal tract as the major source of the postoperative inflammatory reaction. **American Journal Surgery**, v.187, p.372-377, 2004.

KANAMORI, Y.; TERAWAKI, K.; TAKAYASU, H.; SUGIYAMA, M. Interleukin-6 and interleukin-8 play important roles in systemic inflammatory response syndrome of meconium peritonitis. **Surgery Today**, v. 42, p. 431-434, 2012.

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

LUK, J.M.; TUNG, P.H.; WONG, K.F.; CHAN, K.L.; LAW, S.; WONG, J. Laparoscopic surgery induced interleukin-6 levels in serum and gut mucosa: implications of peritoneum integrity and gas factors. **Surgery Endoscopic**, v.23, p.370-376, 2009.

MADUREIRA, K.M. **Citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no sangue e colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa: importância na transferência de imunidade passiva.** Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária, São Paulo, 2011.

MAEDA, Y.; OHTSUKA, H.; TOMIOKA, M. OIKAWA, M. Effects of progesterone on Th1/ Th2/Th17 and Regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows. **Veterinary Research LE**

MARIK, P.E.; FLEMMER, M. The immune response to surgery and trauma: Implications for treatment. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 73, p. 801-808, 2012.

MEALEY R.H., STONE D.M., HINES M.T., ALPERIN D.C., LITCKE M.H., LEIB S.R.; LEACH, S.E.; HINES, S.A. Experimental Rhodococcus equi and equine infectious anemia virus DNA vaccination in adult and neonatal horses: effect of IL-12, dose, and route. **Vaccine**, v.25, p.7582–7597, 2007.

MENDES, L.C.N.; PEIRO, J.R.; FEITOSA, F.L.; LUVIZOTTO, M.C.; BORGES, A.S.; CIARLINI, P.C.; PERRI, S.H. Effect of age and abomasal puncture on peritoneal fluid, hematology, and serum biochemical analyses in young calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 899-904, 2005.

MESINKOVA, M.; STEPANOVA, H.; FALDYNA, M. Interleukin-17 in veterinary animal species and its role in various disease: a review. **Cytokine**, v.64, p. 11-17, 2013.

MOEHRLEN, U.; LECHNER, A.; BAUMEL, M.; DOSTERT, K.; ROHRL, J.; MEULI, M.; MANNEL, D.N.; HAMACHER, J. Immune cell populations and cytokine production in spleen and mesenteric lymph nodes after laparoscopic surgery versus conventional laparotomy in mice. **Pediatric Surgery Internal**, v. 28, p. 507-513, 2012.

MORRIS, D.D.; MOORE, J.N.; CROWE, N. Serum tumor necrosis factor activity in horses with colic attributable to gastrointestinal tract disease. **American Journal Veterinary Research**, v.52, p.1565-1569, 1991.

MOURA, H.V.; POMERANTZEFF, P.M.A.; GOMES, W.J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **Revista Brasileira Cirurgia Cardiovascular**, v. 16, p. 376-387, 2001.

MULLER, W.; SCHLEGEL, F.; HAASE, H.; HAASE, G. Congenital umbilical hernia in the calf (Zum angeborenen Nabelbruch beim Kalb). **Monatshefte fur Veterinarmedizin**, v.43, p.161-163, 1988

NGUYEN-VERMILLION, A.; JUUL, S.E; McPHERSON, R.J; LEDBETTER, D.J. Time course of C-reactive protein and inflammatory mediators after neonatal surgery. **Wound Repair Regeneration**, v.14, p.259-264, 2006.

O'BYRNE, P.M. Cytokines or their antagonists for the treatment of asthma. **Chest**, v.130, p. 244-250, 2006.

OEHME, F.W. Cytologic examination of the peritoneal fluid in the diagnosis of cattle disease. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 155, p.1923-1927, 1969.

OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K., ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. C. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 255-265, 2011.

ONO, S.; AOSASA, S.; MOCHIZUKI, H. Effects of a protease inhibitor on reduction of surgical stress in esophagectomy. **American Journal Surgery**, v. 177, p. 78-82, 1999.

ORSINI, J.A. GALLIGAN, D.T. REEVES, M. Determining a prognosis for equine abdominal crisis (colic). **The Equine Practice**, v. 13, p. 9-14, 1991.

PEIRÓ, J.R.; LUCATO, B.; MENDES, L.C.N.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, F.L.F.; BONELLO, F.L.; MAEMURA, S.M.; SOARES, G.T.; SANTANA, A.E.; PERRI, S.H.V. Evaluation of cytologic and biochemical variables in blood, plasma, and fluid from calves before and after umbilical herniorrhaphy. **American Journal of Veterinary Research**, v.70, p.423-432, 2009.

PELIZON, A.C.; DENADAI, B.; SCHIAVON, E.V.; MARTINS, D.R.; ZORELLA, S.F.G.; SARTORI, A. Produção deficiente de citocinas Th1 em camundongos BALB/c jovens. **Revista Ciência Básica Aplicada**, v. 28, p. 171-176, 2007.

POLÓ, T.S. **Concentrações plasmáticas e peritoneal da proteína de fase aguda HMGB1 em bezerros portadores ou não de hérnia umbilical**. Dissertação(Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2013.

POTTER, T. Umbilical masses in calves. **Livestock**, v. 12, p.47-51, 2007.

RAEBURN, C.D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K.A. Cytokines for surgeons. **American Journal Surgery**, v. 183, p.268-273, 2002.

REN, X.; LI, J.; ZHOU, X. Recombinant murine interleukin 4 protein therapy for psoriasis in a transgenic VEGF mouse model. **Dermatology**, v. 219, p. 232-238, 2009.

RILEY, C.B.; CRUZ, A.M.; BAILEY, J.V.; BARBER, S.M.; FRETZ, P.B. Comparison of herniorrhaphy versus clamping of umbilical hernias in horses: A retrospective study of 93 cases (1982-1994).**The Canadian Veterinary Journal**, v.37, p. 295-298, 1996.

RINGS, M. Umbilical hernias, umbilical abscesses, and urachal fistulas. **Veterinary Clinics Of North America.**, v. 11, p. 137-148, 1995.

SATWANI, P.; MORRIS, E.; VAN DE VEM, C.; CAIRO, M.S. Dysregulation of expression of immunoregulatory and cytokine genes and its association with the immaturity in neonatal phagocytic and cellular immunity. **Biollogy Neonate**, v. 88, p. 214-27, 2005.

SCHAIBLE, T.; VEIT. M.; TAUTZ, J.; KEHL, S.; BUSING, K., MONZ, D.; GORTNER, L.; TUTDIBI, E. Serum cytokine levels in neonates with congenital diaphragmatic hernia. **Klinische Padiatrie**, v.7, p.414-8, 2011.

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

SCHEIN, M.; WITTMANN, D.H.; HOLZHEIMER, R. Hypothesis: compartmentalization of cytokines in intraperitoneal infection. **Surgery**, v. 119, p.694-700, 1996.

SCHEINGRABER, S.; BAUERFEIND, F., BOHME, J. Limits of peritoneal cytokine measurements during abdominal lavage treatment for intraabdominal sepsis. **American Journal Surgery**, v.181, p. 301-308, 2001.

SCHENKIN, A.; FRASER, W.D.; SERIES, J. The serum interleukin 6 response to elective surgery. **Lymphokine Research**, v. 8, p. 123-127, 1989.

SECOR, E.J.; MATYCHAK, M.B.; FELIPPE, M.J.B. Transfer of tumour necrosis factor- α via colostrum to foals. **Veterinary Record**, v. 170, p.51, 2013.

SHEN, H.; YAO, P.; LEE, E.; GREENHALGH, D. Interferon-gamma inhibits healing post scald burn injury. **Wound Repair Regeneration**, v.20, p.580–591, 2012.

SHEORAN, A.S.; TIMONEY, J.F.; HOLMES, M.A.; KARZENSKI, S.S.; CRISMAN, M.V. Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses. **American Journal Veterinary Research**, v.61, p.1099–1105, 2000.

SILVEIRA, F.P.; NICOLUZZI, J.E.; SAUCEDO JÚNIOR, N.S.; SILVEIRA, F.; NICOLLELLI, G.M.; MARANHÃO, B.S.A. Avaliação dos concentrações séricas de interleucina-6 e interleucina-10 nos pacientes submetidos à colecistectomia laparoscópica *versus* convencional. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v.39, 2012.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain. in: BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F.; DICKENFON, A. (Ed.) **Pharmacology of pain**. Part II. Specific pharmacological pain targets. IASP: Seattle, 2010. p. 279-302.

SORDILHO, L.M. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1851- 1865, 1997.

STEVERINK, P.J.G.M.; STURK, A.; RUTTEN, V.P.M.G.; WAGENAAR-HILBERS, J.P.A.; KLEIN, W.R.; VAN DER VELDEN, M.A.; NÉMETH, F. Endotoxin, interleukin-6 and tumor necrosis factor concentrations in equine acute abdominal disease: relation to clinical outcome. **Innate Immunity**, v. 2, p. 289-299, 1995.

TALAT, N.; SHAHID, F.; PERRY, S.; DAWOOD, G.; HUSSAIN, R. Th1/ Th2 Cytometric Bead Array can discriminate cytokine secretion from endogenously activated cells in pulmonary disease, recent and remote infection in tuberculosis. **Cytokine**, v. 54, p. 136-143, 2011.

TAMAI, K.; ISHIKAWA, H.; MAUVIEL, A.; UITTO, J. Interferon γ coordinately upregulates matrix metalloprotease (MMP)-1 and MMP-3, but not tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP), expression in culture keratinocytes. **Journal Investigation Dermatology**, v.104, p.118-121,1995.

THOMPSON-SNIPES, L.; DHAR, V.; BOND, M.W.; MOS-MANN, T.R.; MOORE, K.W.; RENNICK, D.M. Interleukin 10: a novel stimulatory factor mast cells and their progenitors. **Journal Experimental Medicine**, v 173, p.507-510, 1991.

TRENT, A.M.; SMITH, D.F. Surgical management of umbilical masses with associated umbilical cord remnant injection in calves. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.185, p. 1531-1534, 1984.

TSUKADA, K.; KATOH, H.; SHIOJIMA, M. Concentrations of cytokines in peritoneal fluid after abdominal surgery. **Europe Journal Surgery**, v. 159, p. 475-479, 1993.

UENO, C.; HUNT, T.K.; HOPF, H.W. Using physiology to improve surgical wound outcomes. **Plastic Reconstruction Surgery**, v.117, p.59S–71S, 2006.

VAN BERGE HENEGOUWEN, M.I.; VAN DER POLL, T.; VAN DEVENTER, S.J. Peritoneal cytokine release after elective gastrointestinal surgery and postoperative complications. **American Journal Surgery**, v. 175, p. 311-316, 1998.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, p. 146-154, 2001.

WAGNER, B.; BURTON, A.; AINSWORTH, D. Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. **Veterinary Research**, v.41, p.47-60, 2010.

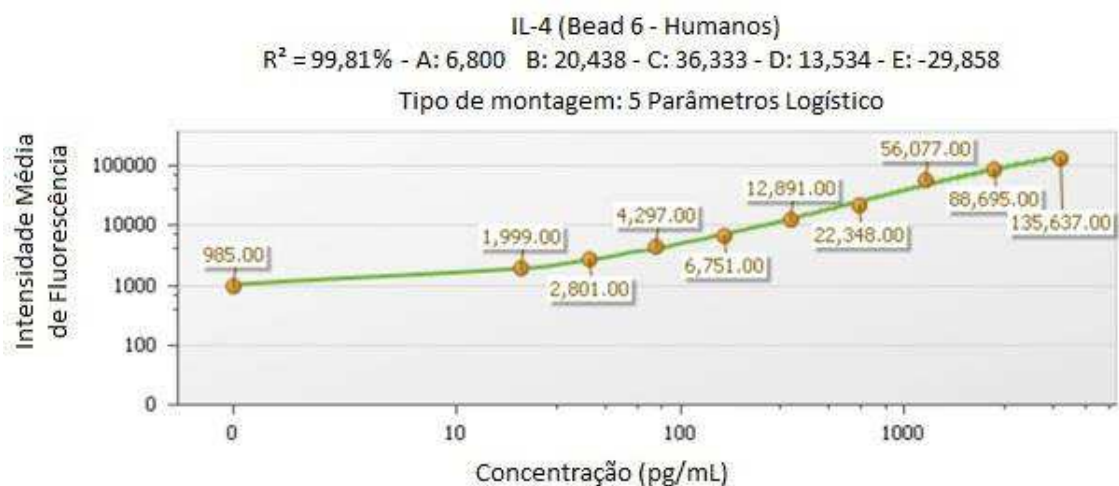
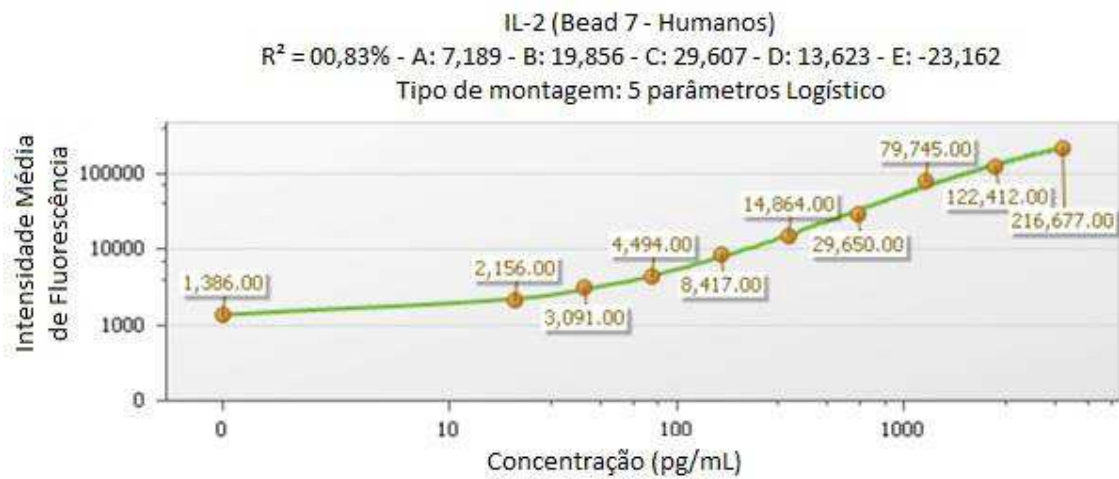
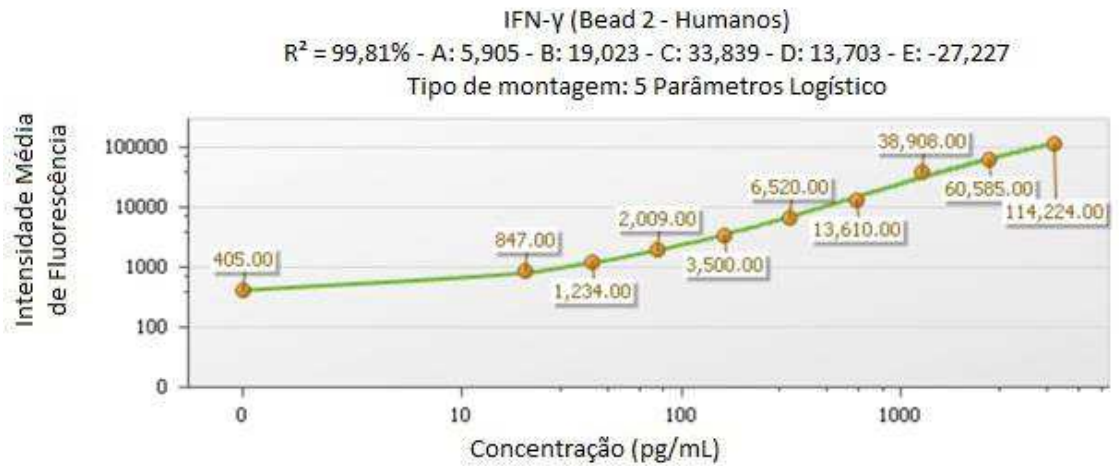
WIJK, H.; KARTTUNEM, R. H. Maximal local and minimal systemic cytokine response to colorectal surgery: the influence. **Cytokine**, v. 14, p. 188-192, 2001.

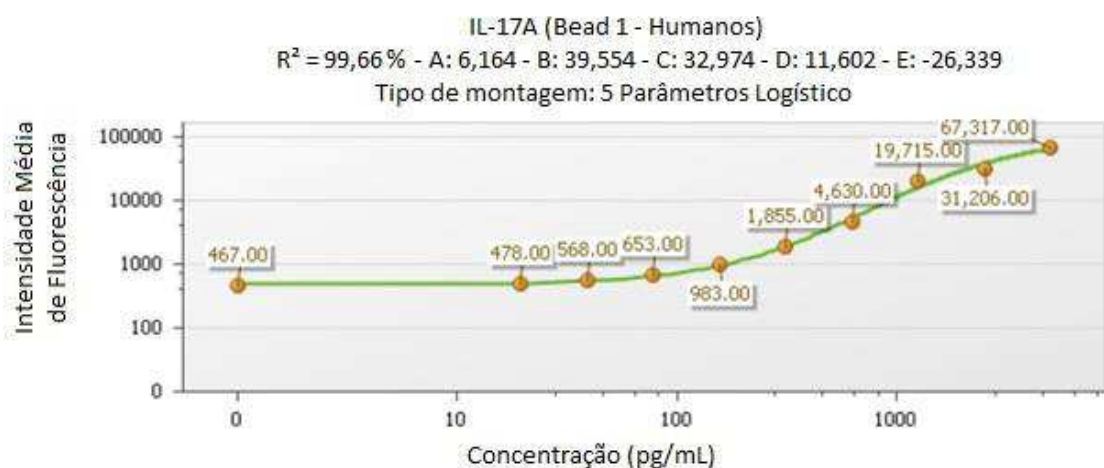
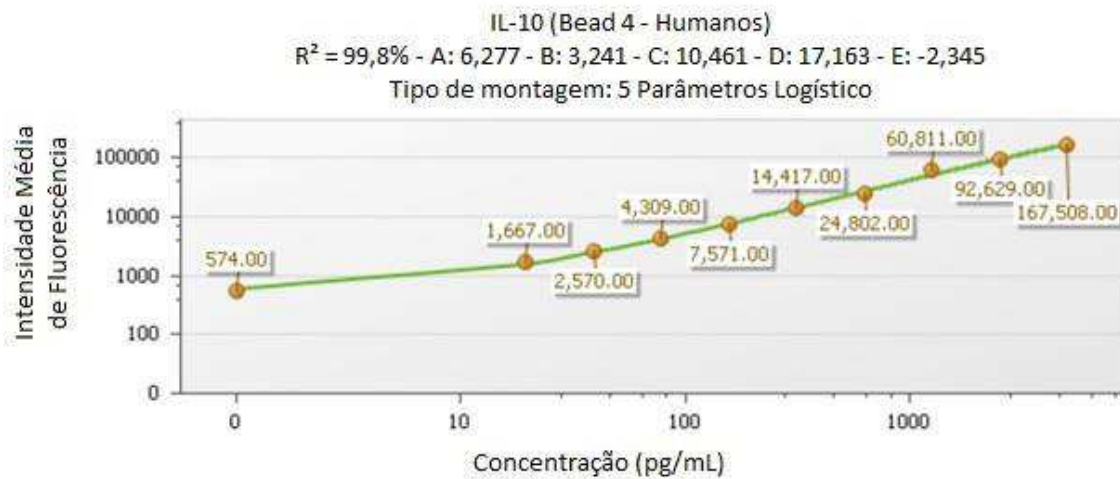
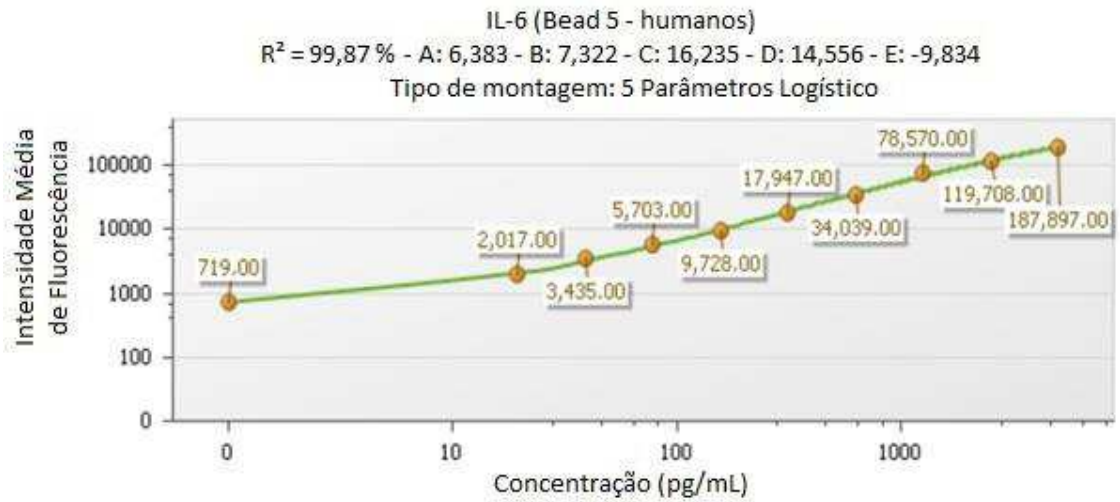
WORTEL, C.H.; VAN DEVENTER, S.J.; AARDEN, L.A. Interleukin-6 mediates host defense responses induced by abdominal surgery. **Surgery**, v. 114, p.564-570, 1993.

YAMANAKA, H.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Transient detection of proinflammatory cytokines in sera of colostrums-fed newborn calves. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p.813-816, 2003.

ZHU, P.; JIANG, H.; FU, J.; CHEN, W.; WANG, Z.; CUI, L. Cytokine levels in abdominal exudate predict prolonged postoperative ileus following surgery for colorectal carcinoma. **Oncology letters**, v.6, p.835-839, 2013.

APÊNDICE





Apêndice A- Curvas-padrão usadas em citometria de fluxo para cada citocina humana (TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A e IFN- γ).