

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

**CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICA E PERITONEAL DA
PROTEÍNA DE FASE AGUDA ATIVINA A EM
BEZERROS PORTADORES OU NÃO DE HÉRNIAS
UMBILICAIS**

Juliana Alves Nunes Lima

Médica Veterinária

ARAÇATUBA - SP

2015

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

**CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICA E PERITONEAL DA
PROTEÍNA DE FASE AGUDA ATIVINA A EM
BEZERROS PORTADORES OU NÃO DE HÉRNIAS
UMBILICAIS**

Juliana Alves Nunes Lima

Orientadora: Prof.^a Adjunta Juliana Regina Peiró

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais).

ARAÇATUBA - SP

2015

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

Lima, Juliana Alves Nunes

L732c

Concentrações plasmática e peritoneal da proteína de fase aguda Ativina A em bezerros portadores ou não de hérnias umbilicais / Juliana Alves Nunes Lima. -- Araçatuba: [s.n], 2015.

43 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2015.

Orientador: Prof. Adj. Juliana Regina Peiró

1. Hérnia umbilical. 2. Bovinos. 3. Herniorrafia. 4. Inflamação. 5. Paracentese. I. T.

CDD 636.559059



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



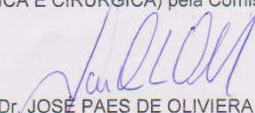
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

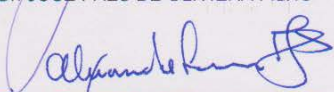
TÍTULO: Concentrações plasmática e peritoneal da proteína de fase aguda ativina A em
bezerros portadores ou não de hérnias umbilicais

AUTORA: JULIANA ALVES NUNES LIMA

ORIENTADORA: Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ

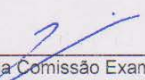
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL
(FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dr. JOSÉ PAES DE OLIVEIRA FILHO


Dr. ALEXANDRE SECORUN BORGES


Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ

DATA DA REALIZAÇÃO: 21 de janeiro de 2015.


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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA ALVES NUNES LIMA – Londrina - PR, 08 de Maio de 1985. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes em Julho de 2008. Desde 2012 é aluna do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo, sendo bolsista CAPES de Setembro de 2012 a Agosto de 2013.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa (2012/00334-3) essencial para a realização deste projeto de pesquisa.

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa de demanda social para o programa, possibilitando-o repassá-la para mim no primeiro ano do mestrado.

À professora e orientadora Juliana Regina Peiró, pela ajuda, orientação e paciência.

À Deus por ter guiado meus passos me permitindo chegar até aqui.

À minha mãe Arlete, pessoa que eu mais amo nesse mundo e que sempre se dedicou com muito amor e carinho.

Ao meu padrasto Alci, sempre disposto ajudar em tudo com muita dedicação.

À minha querida irmã Izabela, que nunca deixou de me amar e me apoiar mesmo quando à distância e ainda me presenteou com as minhas joias mais preciosas, meus sobrinhos, Manoela e Lucas.

Aos amigos de longa data, dádivas divinas, essências na trajetória da vida.

Às amizades feitas em Araçatuba que de certa forma se tornaram muito especiais em minha vida.

Aos amigos de pós-graduação, denominados Gangue Peiró, pelo apoio, compreensão, incentivo, amizade e companheirismo.

À Todos **MUITO OBRIGADA!!!!!!**

SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	
Abstract.....	
I. INTRODUÇÃO.....	10
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Ativina.....	14
2.1.1 Sinalização.....	17
2.1.2 Ação Biológica.....	18
III. MATERIAL E MÉTODO.....	24
3.1 Animais.....	24
3.2 Delineamento experimental.....	24
3.3 Amostras.....	26
3.3.1 Sangue.....	26
3.3.2 Líquido peritoneal.....	26
3.4 Procedimento cirúrgico.....	27
3.5 Avaliação clínica e laboratorial.....	28
3.6 Quantificação das concentrações de ativina A.....	28
3.7 Análise estatística.....	29
IV RESULTADOS.....	30
V DISCUSSÃO.....	32
VI CONCLUSÕES.....	35
VII REFERÊNCIAS.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ActR = Receptor de ativina

ALK = Quinase semelhante a receptor de ativina

ANOVA = Análise de variância

HRP = Peroxidase de rábano

HU = Hérnia umbilical

IL-1 β = Interleucina 1 beta

IL-6 = Interleucina 6

IL 11 = Interleucina 11

IL 18 = Interleucina 18

LDH = Lactato desidrogenase

MAPK = Proteína quinase ativada por mitógenos

mRNA = RNA mensageiro

SNC = Sistema nervoso central

TGF- β = Fator de crescimento transformador β

TLR = Receptor toll-like

TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa

VEGF = Fator de crescimento endotelial vascular

CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICA E PERITONEAL DA PROTEÍNA DE FASE AGUDA ATIVINA A EM BEZERROS PORTADORES OU NÃO DE HÉRNIA UMBILICAIS

RESUMO - As ativinas são citocinas membros da superfamília do fator de crescimento transformador- β (TGF β) que podem ser sintetizadas por quase todos os tipos celulares no organismo e assim a maioria dos tecidos têm a capacidade de ser fonte de ativina A na circulação. Desta forma, os objetivos desse estudo foram determinar se as concentrações plasmáticas e peritoneais da ativina A sofrem alterações em bezerros portadores ou não de hérnia umbilical (HU) antes e após a correção cirúrgica e em qual compartimento o seu aumento refletiria melhor e mais rapidamente as alterações inflamatórias, seu papel como indicador da inflamação na cavidade abdominal e sua correlação entre concentrações plasmáticas e peritoneais e ainda estabelecer intervalos de referência para a variável em cada grupo. Foram utilizados vinte bezerros holandeses com (n=10) ou sem HU (n=10), bezerros com HU foram submetidos à herniorrafia. Sangue total e líquido peritoneal foram coletados dos 20 animais para a quantificação da ativina A pelo teste ELISA nos dias 0 (antes da cirurgia) 1, 3, 5, 7 e 15. Dados dos dois grupos foram comparados. As concentrações plasmáticas e peritoneais de ativina A no grupo controle não tiveram alterações ao longo do tempo, porém no grupo experimental houve um aumento da concentração plasmática 15 dias após a herniorrafia em relação ao momento basal. Quando comparados os grupos, as concentrações plasmáticas de ativina A do grupo experimental estavam diminuídas no 3º dia e aumentadas no 15º dia após a cirurgia em relação aos animais do grupo controle, enquanto a concentração peritoneal apresentou-se aumentada 5 dias após a herniorrafia no grupo experimental em relação ao grupo controle.

Palavras-chave: bovinos, herniorrafia, inflamação, paracentese, ativina.

PLASMATIC AND PERITONEAL CONCENTRATION OF ACUTE PHASE PROTEIN ACTIVIN A IN CALVES WITH OR WITHOUT CONGENITAL UMBILICAL HERNIA

SUMMARY - Activins are members of the transforming growth factor β (TGF- β) superfamily and can be synthesized by almost all cell types in the body and most tissues has the ability to be a source of activin A in circulation. Thus, the objectives of this study were to determine if plasma and peritoneal concentrations of activin A change in calves with or without umbilical hernia (UH) before and after surgery and in which compartment its increase would reflect better and faster inflammatory changes. Its role as an inflammatory biomarker in the abdominal cavity and the correlation between plasma and peritoneal concentrations, and establish reference intervals for the variable in each group. Twenty Holstein calves were used with (n = 10) or without HU (n = 10), calves with HU underwent herniorrhaphy. Whole blood and peritoneal fluid were collected from 20 animals for quantification of activin A by ELISA on days 0 (before surgery) 1, 3, 5, 7 and 15. Data were compared between the two groups. Plasma and peritoneal concentrations of activin A in the control group did not change over time, but in the experimental group there was an increase in the plasma concentration 15 days after herniorrhaphy compared to baseline. When comparing the groups, the plasma concentrations of activin A in the experimental group were decreased on day 3 and increased on the 15th day after surgery compared to the control group animals, while the peritoneal concentration had increased 5 days after herniorrhaphy repair in the experimental group compared to the control group.

Keywords: cattle, herniorrhaphy, inflammation, paracentesis, activin.

I INTRODUÇÃO

As onfalopatias representam um dos principais problemas dos bezerros nos rebanhos brasileiros tendo como causas principais, fatores ambientais, higiênicos, traumáticos, bacterianos e congênitos, que isolados ou em associação provocam processos inflamatórios e/ou infecciosos nas estruturas umbilicais (DONOVAN et al., 1998; RADOSTITS et al., 2002).

As hérnias umbilicais consistem na falha do fechamento do anel umbilical, e vísceras abdominais podem ou não se projetar pelo anel para dentro do saco herniário (HAEYS, 1974; SMITH, 2006). As hérnias podem ocorrer em todos os animais domésticos, especialmente suínos, bovinos e equinos, e podem ser redutíveis ou não (KERSJES et al., 1985). Em bovinos é uma condição congênita frequente, mais comumente observada na raça holandesa (HAEYS, 1974; SMITH, 2006; WEAVER et al., 2005) representando de 8 a 30% dos defeitos congênitos encontrados nesta espécie (BAHR; DISTL, 2005), e pode ser herdada por um caráter dominante ou ser condicionada por fatores ambientais (ANDERSON, 2004; WEAVER et al., 2005). A infecção umbilical pode resultar em enfraquecimento da parede abdominal adjacente e provocar hérnia umbilical adquirida (ANDERSON, 2004).

Vários parâmetros são úteis para especificar condições patológicas dentro da cavidade abdominal, mais precisamente, indicadores de processos inflamatórios (como o fibrinogênio, proteína C-reativa e citocinas) e de infecção bacteriana (glicose, bactérias e D-lactato) ou danos celulares e isquemia (L-lactato, hemoglobina, fosfato inorgânico, e as enzimas lisossomais fosfatase alcalina, LDH e creatina quinase) (WITTEK et al., 2011). Em equinos, doença abdominal aguda está associada à significativa morbidade e mortalidade (FORBES et al., 2011; MAIR; SMITH, 2005) e vários biomarcadores inflamatórios foram avaliados a fim de facilitar o diagnóstico, acompanhamento e prognóstico da doença (FORBES et al., 2011).

Recentemente, a proteína de fase aguda ativina A tem ganho destaque na literatura como um marcador importante da resposta inflamatória e preditor de prognóstico em casos clínicos (ANTSIFEVORA; WERNER, 2012; FORBES et al., 2011; HEDGER et al., 2011; MICHEL et al., 2003; PHILLIPS et al., 2009; YNDESTAD et al., 2009).

Ativinas e inibinas são membros da super família do fator de crescimento transformador β (TGF- β) (ALEMAN-MUENCH; SOLDEVILA, 2012; HEDGER et al., 2011; PHILIPS et al., 2009), e juntamente com a folistatina, uma proteína de ligação de elevada afinidade a ativina, formam um grupo de fatores inter-relacionados (PHILIPS, 2005), que foram inicialmente descritas como reguladoras dos processos reprodutivos em mamíferos e foram nomeadas pela primeira vez após o seu efeito positivo e negativo na liberação do hormônio folículo-estimulante da glândula pituitária, respectivamente (ALEMAN-MUENCH; SOLDEVILA, 2012).

Com efeitos amplos e complexos sobre o crescimento e diferenciação celular, a ativina A é conhecida por ser reguladora crítica da inflamação e imunidade (HEDGER et al., 2011). As ativinas são proteínas que possuem ambas as atividades pró- e anti-inflamatórias e já foram descritas por desempenhar um papel importante no controle da cascata de citocinas que leva à resposta inflamatória (JONES et al., 2004b; KRETZER et al., 2012; MICHEL et al., 2003).

A ativina é rapidamente liberada dentro da circulação no endotélio vascular e em outros tecidos durante a inflamação (FORBES et al., 2011). O mediador desempenha um papel fundamental em diversos aspectos da resposta inflamatória, incluindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, produção de óxido nítrico e ativação de leucócitos (FORBES et al., 2011). Concentrações séricas e teciduais elevadas deste mediador têm sido demonstradas em uma grande variedade de condições inflamatórias agudas e crônicas em seres humanos, incluindo septicemia e doença inflamatória intestinal (FORBES et al., 2011; HUBNER et al., 1997; MICHEL et al., 2003).

A molécula de ativina e sua proteína de ligação, folistatina, são amplamente encontradas no organismo. Há um interesse cada vez maior nas ativinas devido à sua capacidade de regular a inflamação, fibrose e imunidade em uma ampla variedade de sistemas (sistema imune, em tecidos hepáticos, renais, pulmonares, gástrico, entre outros, câncer e na biologia da pele) (HEDGER et al., 2011).

Recentemente a ativina foi avaliada em equinos em várias doenças inflamatórias abdominais agudas (intestino delgado: obstrução não estrangulante, vólvulo, encarceramento forame epiplóico, intussuscepção; cólon maior: deslocamento, impactação, obstrução estrangulante, vólvulo; intussuscepção ileocecal; peritonite, colite, enterite) (FORBES et al., 2011). Em humanos, o aumento da expressão da subunidade βA foi observado em amostras cirúrgicas intestinais de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn (HUBNER et al., 1997) e mulheres com carcinoma seroso de ovário tiveram altas concentrações de ativina A no líquido peritoneal (COBELLIS et al., 2004). Em ratos, a ativina promoveu aumento da capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais *in vitro* e *in vivo* (WANG et al., 2009).

A análise do líquido peritoneal é um procedimento que possibilita repetição e fornece informações que permitem avaliar a gravidade das lesões abdominais, ajudando a decidir se a cirurgia deve ou não ser realizada (DUCHARME; LOWE, 1988). A avaliação seriada do líquido peritoneal é um indicador útil na avaliação da resposta da peritonite e do trauma abdominal ao tratamento clínico (DYSON, 1983; NAZIFI et al., 2000; PEIRÓ et al., 2009; POLÓ et al., 2013). Caso alterações ou complicações se desenvolvam durante o período pós-operatório (ANDERSON et al., 1993), a determinação dos parâmetros normais do líquido peritoneal seria extremamente importante para a subsequente interpretação destes dados (ANDERSON et al., 1994; PEIRÓ et al., 2009; POLÓ et al., 2013).

A utilização de dados de bovinos adultos ou mesmo bezerros mais velhos pode resultar em interpretações errôneas quando se avalia o líquido peritoneal de bezerros mais jovens (BURTON et al., 1997; PEIRÓ et al., 2009;

POLÓ et al., 2013; RINGS, 1995). Contudo, dados das concentrações desta proteína de fase aguda no plasma e no líquido peritoneal de bezerros jovens portadores ou não de hérnias umbilicais não estão disponíveis. Este fato motivou a realização deste estudo.

II REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ativina

Ativina foi inicialmente descrita como uma proteína que estimula a liberação de hormônio folículo-estimulante da glândula pituitária (ANTSIFEVORA; WERNER, 2012; BREIT, et al., 2000; KIMURA et al., 2007; WERNER; ALZHEIMER, 2006), porém pesquisas posteriores demonstraram que a ativina afeta a proliferação e diferenciação de vários tipos celulares (MUKHOPADHYAY et al., 2007). Nos últimos anos, esse fator multifuncional tem atraído a atenção de pesquisadores de outras áreas, à medida que novas funções da ativina na angiogênese, inflamação, imunidade, fibrose e câncer têm sido descobertas (ANTSIFEVORA; WERNER, 2012).

As ativinas são uma família homóloga de homo e heterodímeros pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformador β (TGF) dos fatores de crescimento e diferenciação (ANTSIFEVORA; WERNER, 2012; HEDGER et al., 2011; HEDGER; KRETZER, 2013; WERNER; ALZHEIMER, 2006) e sua sinalização é um importante regulador de muitos processos celulares (MANG et al., 2013). Possui uma gama de funções biológicas e é amplamente distribuída em vários tecidos e produzida por várias células incluindo macrófagos, T-helper 2 e hepatócitos (WANG, et al., 2013), sua produção é aumentada em várias condições inflamatórias agudas e crônicas, assim sua síntese e liberação é estimulada por citocinas inflamatórias (HEDGER et al., 2011).

Diversas proteínas que se assemelham estruturalmente ao TGF β , com presença de 7 resíduos de cisteínas altamente conservados, passaram a integrar esta superfamília, dentre elas as ativinas, que possuem características mais próximas às dos peptídeos TGF β (KIMURA et al., 2007). O primeiro membro da família identificado e melhor estudado é a ativina A, inicialmente isolada a partir do ovário de porcas (HEDGER; KRETZER, 2013; KIMURA et al., 2007). Devido ao seu papel no sistema reprodutivo foram inicialmente

nomeadas como ativinas, no entanto, estudos demonstraram seus efeitos em uma variedade de sistemas, incluindo hematopoiese e desenvolvimento de células imunes (HEDGER; KRETSEK, 2013).

As ativinas são proteínas diméricas de aproximadamente 28 kDa, constituídas por duas subunidades β de 116 aminoácidos conectadas por ponte dissulfídica (ANTSIFEVORA; WERNER, 2012; HUBNER et al., 1996; KIMURA et al., 2007; WERNER; ALZHEIMER, 2006). Até o momento, foram descritas cinco subunidades β das ativinas (β A, β B, β C, β D e β E), todas as subunidades, com exceção da β D, foram isoladas em mamíferos, sendo as subunidades β A, β B e β C identificadas em humanos (KIMURA et al., 2007).

Semelhante a outros fatores de crescimento e diferenciação, a ativina bioativa é um produto de uma proteína precursora inativa, este precursor é um dímero de 110 kDa, que inclui um peptídeo de sinal, um pró domínio glicosilado e o domínio C-terminal maduro (bioativo) (PANGAS; WOODRUFF, 2000), os quais são processados por hidrólise enzimática ou ácida (HEDGER; KRETSEK, 2013). A proteína madura não é glicosilada, e o processamento intracelular da proteína é necessário para a atividade biológica plena (PANGAS; WOODRUFF, 2000). Assim como outros membros da família TGF β , são produzidas como precursores inativos, os quais são clivados no retículo endoplasmático (ANTSIFEVORA; WERNER, 2012). Após tradução em proteína, é armazenada por certos tipos de células, incluindo as células da medula óssea e células epiteliais (HEDGER; KRETSEK, 2013).

A ativina é descrita como um fator de crescimento que promove diferentes respostas biológicas ligando-se a dois pares de receptores de membranas do tipo I e II e ativando uma sinalização intracelular mediada pelas proteínas SMAD (KIMURA et al., 2007).

Com base na expressão do mRNA e na localização ou secreção da proteína, a ativina A é produzida por diferentes tipos celulares durante a inflamação, imunidade e fibrose, incluindo células epiteliais, neuronais, endoteliais, estromais da medula óssea, da musculatura lisa, mielóides (macrófagos/monócitos e células dendríticas), granulócitos (neutrófilos e

mastócitos), hepatócitos e células estreladas, queratinócitos e algumas células T (HEDGER et al., 2011).

As ativinas A e B são altamente conservadas entre as espécies, exibindo conservação maior que 97% entre humanos e marsupiais, monotremados e aves (HEDGER; KRETZER, 2013), sendo que a homologia da ativina A humana e bovina é de 98% (FORBES et al., 2011; PHILLIPS, 2005). O teste ELISA utilizado para detectá-las em seres humanos já foi validado para uso em ovinos, bovinos, ratos e camundongos (FORBES et al., 2011; PHILLIPS, 2005) e ambas são facilmente mensuráveis no sangue e outros fluidos biológicos (HEDGER; KRETZER, 2013), porém tem sido difícil identificar a principal fonte destas proteínas circulantes por inúmeras razões, principalmente devido aos seus genes que são amplamente expressos (HEDGER et al., 2011).

Um componente chave da resposta inflamatória é a liberação estruturada e ordenada de citocinas pró-inflamatórias, tais como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ e IL-6 , citocinas clássicas de liberação precoce, que estimulam a produção de prostaglandinas tanto periférica quanto centralmente e assim como essas citocinas clássicas, os níveis de ativina A também aumentam em resposta a inflamação (JONES et al., 2004b).

A Ativina A é liberada no início do processo inflamatório, como parte da cascata de citocinas circulatórias durante a inflamação sistêmica aguda, esta liberação ocorre simultaneamente com o $\text{TNF}\alpha$ e anterior a liberação de IL-6 e folistatina. Como vasos sanguíneos compreendem cerca de 2% da massa corporal, as células sanguíneas circulatórias e do endotélio vascular são candidatas a esta rápida liberação na circulação e potencialmente uma grande fonte de ativina A (JONES et al., 2004a).

Foi estabelecido que a expressão gênica de ativina A é estimulada através de várias vias de sinalização pró-inflamatórias e imunorreguladoras (HEDGER; KRETZER, 2013). A liberação de ativina A na inflamação aguda é um componente muito precoce e crítico da resposta imune inata (PHILLIPS et al., 2009).

2.1.1 Sinalização

Assim como a maioria dos membros da família TGF- β , as ativinas medeiam os seus efeitos biológicos através de receptores transmembrana de serina/treonina quinase (HEDGER et al., 2011; WERNER; ALZHEIMER, 2006), que são divididos em tipo I (ActR I) e tipo II (ActR II) (WANG, et al., 2013).

Na superfície celular a ativina se liga ao tipo II (ActR II ou ActR IIB) e este recruta o tipo I (KIMURA et al., 2007; PANGAS; WOODRUFF, 2000; WERNER; ALZHEIMER, 2006). Dois receptores do tipo I são conhecidos: ActR IB [quinase semelhante a receptor de ativina-4 (ALK-4)] e ActR I [quinase semelhante a receptor de ativina-2 (ALK-2)] (HUBNER et al., 1996; PANGAS; WOODRUFF, 2000; WERNER; ALZHEIMER, 2006). Dentre as isoformas de ActR I, o ActR IB propaga a sinalização intracelular de ativina pela ativação e fosforilação de proteínas citoplasmáticas da família SMADs conhecidas como SMADs ativadas por receptor (R-SMADs); SMAD2 e SMAD3. A fosforilação de R-SMADs permite a sua interação com co-fatores [co-SMAD (SMAD4)], formando um complexo capaz de atingir o núcleo, onde irão modular a transcrição de genes alvo (KIMURA et al., 2007) e dependendo dos fatores de transcrição que elas interagem, as proteínas SMADs podem estimular ou suprimir a expressão do gene alvo (CHEN et al., 2002).

A sinalização é atenuada por SMAD7, uma SMAD inibitória (I-SMAD) que atua com reguladora negativa da via de transdução de sinal, essa que pode se ligar ao receptor de tipo I, prevenindo associação SMAD-receptor, ou por ligação competitiva com SMAD4, que bloqueia a translocação de SMAD (KIMURA et al., 2007; PANGAS; WOODRUFF, 2000).

O papel de cada receptor não foi delineado, embora cada um difira na afinidade e podem ser expressos diferencialmente para ativar diferentes aspectos da cascata de sinalização (PANGAS; WOODRUFF, 2000).

Induzida pela ativina, a sinalização celular pode ser modificada por interações SMAD com outras vias de transdução de sinal (PANGAS; WOODRUFF, 2000). Embora a maior parte das funções das ativinas pareça ser mediada através da via SMAD, a sinalização MAPK (que são reguladores

chave dos genes da inflamação, estresse, imunidade) (HEDGER et al., 2011) também controla algumas de suas funções, tal como a estimulação da migração dos queratinócitos (ANTSIFEVORA; WERNER, 2012).

2.1.2 Ação Biológica

As ativinas exercem efeitos reguladores sobre a hematopoiese, inflamação e imunidade, em diferentes tipos de células e tecidos (HEDGER; KRETZER, 2013), desempenhando um papel importante na regulação da liberação do hormônio pituitário, sobrevivência do neurônio, no desenvolvimento precoce de embriões (WANG, et al., 2013), na neurogênese, na apoptose e angiogênese tumoral (HEDGER; KRETZER, 2013); incluindo ainda efeitos sobre controle da proliferação e diferenciação celular, e reparo tecidual (KIMURA et al., 2007). Funções importantes das ativinas no desenvolvimento, homeostase e reparo tecidual têm sido identificadas (ANTSIFEVORA, WERNER; 2012) após lesão aguda ou crônica, bem como em doenças inflamatórias (WERNER; ALZHEIMER, 2006).

Várias proteínas de ligação foram descritas, as quais inibem os efeitos das ativinas, incluindo a folistatina (MUNZ et al., 2001; PANGAS, 2000) e proteína relacionada a folistatina (FRP, também designada como folistatina-3), que sequestram as ativinas e assim inibem suas atividades biológicas (WERNER; ALZHEIMER, 2006). A folistatina é uma proteína endógena de elevada afinidade a ativina, que pode modular a bioatividade das ativinas (HEDGER; KRETZER, 2013) tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MUKHOPADHYAY et al., 2007), através da ligação a ativina, impedindo a interação da citocina com seus receptores de superfície celular tipo II (CHEN et al., 2006; MICHEL et al., 2003), consequentemente inibindo a atividade de sinalização das ativinas (CHEN et al., 2006) e além disso ligada às células de superfície a folistatina facilita a degradação lisossômica da ativina A (MICHEL et al., 2003).

A liberação de ativina A e folistatina para a circulação durante episódios inflamatórios foi observada pela primeira vez durante a experimentação *in vivo*

em ovinos, onde estímulos inflamatórios diferentes, como cirurgia e LPS, elevaram as concentrações circulantes de folistatina (JONES et al., 2004a).

Inúmeras evidências de um papel fundamental da ativina e folistatina em inflamação e fibrose destaca o potencial emergente para novos diagnósticos e terapias que visem estes reguladores moleculares (HEDGER; KRETZER, 2013).

A família do TGF β compreende um grande grupo de proteínas estruturalmente relacionadas que inclui vários tipos de TGF β , proteínas morfogenéticas ósseas, substância inibidora mulleriana, e também ativinas e inibinas (CHEN et al., 2002; HUBNER et al., 1996).

Inibinas são heterodímeros homólogos as ativinas de duas subunidades β A ou β B, com uma subunidade α em comum e são designadas inibina A ($\alpha\beta$ A) e inibina B ($\alpha\beta$ B), que atuam como antagonistas da sinalização das ativinas (HUBNER et al., 1996; WALTON et al., 2012; WERNER; ALZHEIMER, 2006). As inibinas atuam como reguladoras da ativina através da ligação ao betaglicano reduzindo a capacidade das ativinas de se ligarem ao receptor tipo II (HARRISON et al., 2004; PHILIPS et al., 2009). Uma vez que tanto a ativina quanto a inibina podem se ligar aos receptores do tipo II, foi proposto que a inibina bloqueia a atividade da ativina por competir com os sítios de ligação dos receptores de sinalização (CHEN et al., 2002). Em geral, a inibina antagoniza a ativina mas nem todos os tipos celulares responsivos a ativina apresentam sensibilidade à inibina (MARINO et al., 2013).

A ação da ativina se inicia com a ligação a uma combinação de receptores de membrana específicos (KIMURA et al., 2007) e possui um papel importante na biologia da pele, quando inicialmente a expressão das subunidades β A e β B aumenta fortemente em queratinócitos e células estromais após a lesão cutânea em ratos e seres humanos (ANTSIFEVORA; WERNER, 2012).

A expressão do mRNA e da proteína estão elevadas na fibrose e durante a cicatrização de feridas após trauma ou por inflamação induzida na pele, fígado, rim e pulmão (HEDGER et al., 2011). Os fatores de crescimento e

citocinas derivados do sangue, a partir de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos induzem a expressão de ativina em fibroblastos e queratinócitos. Além disso, os macrófagos ativados podem contribuir para elevados níveis de ativina na ferida. As funções mais prováveis da ativina na ferida são a indução da produção de matriz extracelular (especialmente de fibronectina) na derme e a regulação da diferenciação de queratinócitos (MUNZ et al., 1999).

Em feridas agudas em ratos e humanos, queratinócitos da epiderme da ferida hiperproliferativa, bem como fibroblastos e células inflamatórias do tecido de granulação foram identificados como fonte de ativina (WERNER; ALZHEIMER, 2006).

Na doença intestinal de humanos, os níveis de expressão de ativina demonstraram uma excelente correlação com o grau de inflamação usando hibridização *in situ*, a mucosa e submucosa de áreas altamente inflamadas foram identificadas como os principais locais de expressão de ativina β A (MUNZ et al., 1999).

Além da ativina, todos seus receptores conhecidos bem como seus antagonistas folistatina e FRP (WERNER; ALZHEIMER, 2006) estão expressos na pele normal e lesada e os níveis de expressão dos mesmos não são alterados após lesões cutâneas (ANTSIFEVORA; WERNER, 2012; WERNER; ALZHEIMER, 2006).

A ativina estimula a proliferação de células ovarianas e testiculares, mas exerce efeito inibitório em diversas outras células de origem epitelial, tais como hepáticas, prostáticas, mamárias, hipofisárias e adrenais (KIMURA et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais a ativina exerce seus efeitos inibitórios são menos conhecidos. Embora existam relatos de que a ativina também possa causar redução da neovascularização em neuroblastoma humano e membranas corioalantóicas de embriões de galinhas (BREIT et al., 2000; CHEN et al., 2002; KIMURA et al., 2007), pesquisas mais recentes demonstram que a ativina A é considerada um fator de modulação do crescimento e diferenciação de células endoteliais *in vitro* e da angiogênese *in*

vivo, sugerindo que esta proteína é um mediador importante da angiogênese induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (HAYASHI et al., 2007). Concentrações sistêmicas aumentadas de ativina A foram observadas durante o processo de neovascularização da córnea em camundongos, correlacionando com os aumentos nos níveis de VEGF (POULAKI et al., 2004).

Em termos de efeitos sobre o sistema imune, dentre as ações primeiramente identificadas estão a capacidade de regular o desenvolvimento e a atividade de células hematopoiéticas e células do sistema imunológico do timo e da medula óssea (HEDGER; KRETZER, 2013).

O papel da ativina A na resposta inflamatória é pouco compreendida, no entanto, dados *in vitro* tenham realçado que ativina A pode ter ambas as ações pró- e anti-inflamatórias sobre mediadores chave da resposta inflamatória, tal como $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β e IL-6. Além disso, dados recentes sugerem que a indução da ativina A se restringe a certos tipos de inflamação e a sua liberação é dependente do ambiente inflamatório (JONES et al., 2004a).

A ativina A quando presente em baixas concentrações promove a inflamação mediada por monócitos/macrófagos em repouso, mas se opõe a atividade inflamatória destas células uma vez que a inflamação está estabelecida e a concentração de ativina aumenta (HEDGER; KRETZER, 2013). Quando os macrófagos estão num estado ativo a ativina A pode ter efeitos anti-inflamatórios, tais como a inibição da conversão do precursor da IL-1 em sua forma ativa, ou a inibição da produção de citocinas pró-inflamatória, tais como $\text{TNF}\alpha$, IL-18 e IL-6 (KRETZER et al., 2012).

Ações pró-inflamatórias da ativina A foram observadas em diferentes tecidos como em macrófagos derivados de medula óssea de ratos e células mononucleares de sangue periférico humano, onde a ativina A é capaz de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 β (JONES et al., 2004a; WERNER; ALZHEIMER, 2006). Sua ação anti-inflamatória está bem caracterizada por ser capaz de antagonizar as ações da IL-6, como também de outras citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-11 e IL-1 β (JONES et al., 2004a). Ambas as funções pró- e anti-inflamatórias da ativina têm sido descobertas

demonstrando ser dependente do tipo de célula e órgão (WERNER; ALZHEIMER, 2006).

Modelos animais demonstraram que a liberação de ativina A e folistatina na circulação são características da resposta ao trauma cirúrgico (KRETZER et al., 2012). Os mecanismos específicos que induzem a secreção de ativina ainda não foram totalmente esclarecidos, mas a sinalização por receptores Toll-like (TLRs) e a cascata inflamatória de citocinas estão envolvidas neste processo. Em algumas situações cirúrgicas, a secreção de ativina pode ser exacerbada pelo uso de anticoagulantes à base de heparina, os quais são capazes de liberar quantidades substanciais de ativina A e folistatina em estudos realizados em animais e humanos (HEDGER; KRETZER, 2013). O efeito da ativina A parece ser bifásico, onde baixas concentrações de ativina A foram estimulantes e altas doses inibitórias em membranas gestacionais humanas (KEELAN et al., 2000), e este seria um bom exemplo de como a concentração local de ativina A pode determinar se ele atua de forma anti- ou pró-inflamatória (JONES et al., 2004a).

Há evidências, particularmente a partir de pacientes com septicemia e hipertensão pulmonar, que concentrações séricas elevadas de ativina A estão relacionadas com a gravidade da inflamação e podem ser preditora da evolução clínica (FORBES et al., 2011; HEDGER et al., 2011; MICHEL et al., 2003; PHILLIPS et al., 2009; YNDESTAD et al., 2009). Na doença inflamatória intestinal de humanos os níveis de expressão de ativina mostraram uma excelente correlação com o grau de inflamação, utilizando hibridização *in situ*, onde a mucosa e submucosa de regiões altamente inflamadas foram identificadas como os principais locais de expressão de ativina β A (MUNZ et al., 1999). Em camundongos e ovelhas que receberam uma dose única de LPS para induzir a inflamação sistêmica, a ativina A foi uma das primeiras citocinas a ser induzida, atingindo um pico na circulação, dentro de 1 h, e portanto precedendo ou coincidindo com os níveis do pico da citocina pró-inflamatória $\text{TNF}\alpha$ (HEDGER et al., 2011).

Na pele, o papel de ativina A na melhoria da cicatrização de feridas foi demonstrado em um modelo experimental utilizando camundongos transgênicos capazes de superexpressar a ativina A sob a influência de um promotor de queratina (MUNZ et al., 1999; PHILIPS, 2001).

A finalidade deste estudo foi:

- Determinar se as concentrações plasmáticas e peritoneais da ativina A sofrem alterações em bezerros portadores ou não de hérnia umbilical antes e após a correção cirúrgica.
- Tentar determinar em qual compartimento o aumento dessa proteína de fase aguda refletiria melhor e mais rapidamente as alterações inflamatórias nesses animais antes e após a correção cirúrgica.
- Estabelecer intervalos de referência para ativina A do líquido peritoneal e do sangue periférico em bezerros portadores ou não de hérnia umbilical antes e após a intervenção cirúrgica.
- Determinar se a ativina A seria um bom indicador da inflamação na cavidade abdominal provocada pela presença da hérnia umbilical ou pelo ato operatório.
- Verificar se houve correlação entre as concentrações de ativina A quantificadas no plasma e no líquido peritoneal.

III MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Vinte bezerros, raça Holandesa, idade variando entre 3 e 8 meses, de ambos os sexos (machos: $n = 3$ e fêmeas: $n = 17$), foram divididos em 2 grupos: controle (animais sem alteração na região umbilical, $n = 10$) e experimental (animais portadores de hérnias umbilicais redutíveis e não inflamadas, $n = 10$). 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 através 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 foram cedidos por proprietários de seis propriedades diferentes na região de Araçatuba. Foi realizado acompanhamento do peso, exame físico e hemograma até o momento em que apresentassem normalidade quando era iniciado as colheitas. 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 nos momentos 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), no entanto sem a realização do procedimento cirúrgico (Figura 2).

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

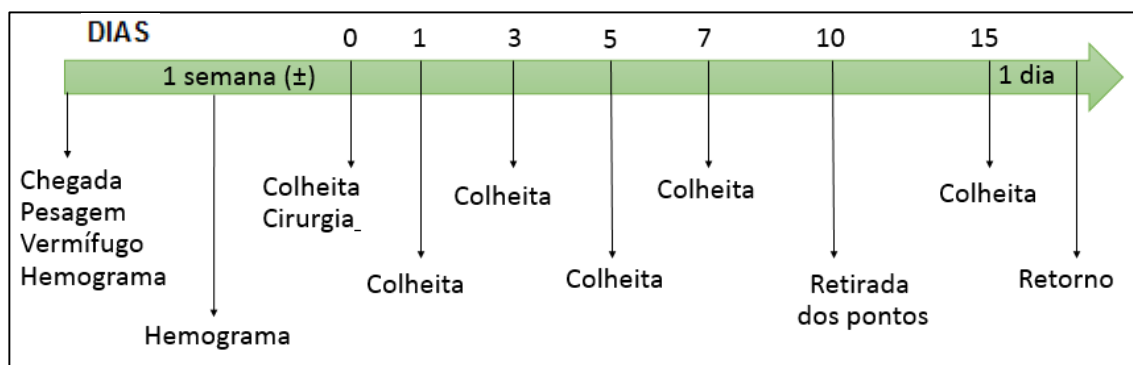


FIGURA 1 – Representação esquemática dos momentos experimentais nos animais do grupo experimental (animais com hérnia umbilical – submetidos ao procedimento cirúrgico).

Fonte: Poló et al., 2013

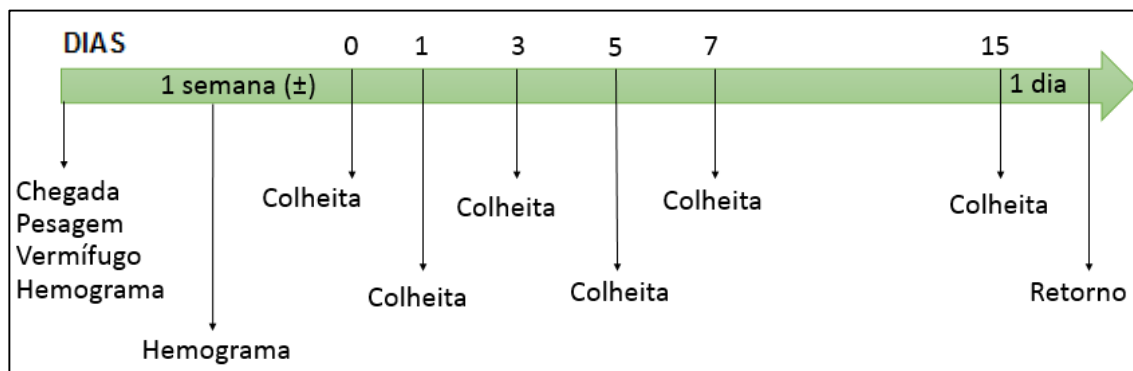


FIGURA 2 – Representação esquemática dos momentos experimentais nos animais do grupo controle (animais sadios não submetidos ao procedimento cirúrgico).

Fonte: Poló et al., 2013

Apenas nos animais que passaram por procedimento cirúrgico (grupo experimental) foi realizado curativo diário com polivinil pirrolidona iodo, repelente e ducha, além de antibioticoterapia com oxitetraciclina de longa duração² e retirada dos pontos com 10 dias de pós-operatório. As amostras de líquido peritoneal e de sangue foram colhidas em tubos contendo citrato de sódio para posterior quantificação da proteína. Imediatamente após as colheitas, estas amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante do líquido peritoneal e o plasma foram alicotados em tubos de

²Terramicina LA 20%, Pfizer Ltda, Campinas, SP, Brasil.

polipropileno de 1,5 mL e congelados a -80°C até o momento de quantificação da ativina A pelo ELISA. As amostras de sangue colhidas em EDTA foram homogeneizadas e utilizadas para realização de hemograma em um contador automático de células.

3.3 Amostras

As amostras que se encontravam hemolisadas foram consideradas parcelas perdidas e com isso o n amostral em alguns momentos foi menor que o estipulado pelo estudo.

3.3.1 Sangue

O sangue foi colhido, em duplicata, em tubos a vácuo ³, contendo EDTA, para a realização do hemograma completo de cada animal por meio de um contador automático de células, e citrato de sódio para a análise da proteína ativina A, nos momentos 0, 1, 3, 5, 7, e 15 dias conforme indicados anteriormente.

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 sódio², para posterior quantificação da ativina A. As colheitas ocorreram nos momentos 0, 1, 3, 5, 7 e 15 dias conforme descrito anteriormente.

Brevemente, os bezerros foram sedados com diazepam ⁴ (0,05 mg/kg de peso vivo, IV) e xilazina ⁵ (0,05 mg/kg peso vivo, IM), e posicionados em decúbito lateral esquerdo com o membro pélvico direito abduzido dorsal e caudalmente. O pelo foi tricotomizado sobre uma área de aproximadamente 15 cm de diâmetro dorsal e caudal ao umbigo. Os pelos também foram tricotomizado em uma área de aproximadamente 10 a 15 cm de diâmetro em um segundo ponto localizado no centro da região inguinal (10 cm caudal à

³Vacutainer, BD, Plymouth, Reino Unido.

⁴Compaz, Cristália, Itapira, SP, Brasil..

⁵Coopazine, Coopers, Cotia, SP, Brasil.

cicatriz umbilical e 10 cm lateralmente em direção à região inguinal). A pele em ambos os locais foi preparada assepticamente com polivinil pirrolidona iodo⁶. No primeiro ponto para a realização da abdominocentese (oposto a cicatriz umbilical, 4 a 5 cm dorsolateral a partir da linha branca) foi inserida uma agulha 14G x 5,9 cm 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 poliestireno⁷ (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 sódio. As amostras foram centrifugadas à 10.000 rpm durante 5 minutos e transferidas para tubos de polipropileno (1,5 mL) sendo congeladas a -80°C até o momento da quantificação.

3.4 Procedimento Cirúrgico

Os bezerros foram sedados com diazepam³ (0,05 mg/kg de peso vivo, IV) e xilazina⁴ (0,05 mg/kg peso vivo, IM), e posicionados em decúbito dorsal. O pelo foi tricotomizado sobre uma área de aproximadamente 15 cm de diâmetro dorsal e caudal ao umbigo. A pele e a parede abdominal próximas ao anel herniário foram infiltradas com lidocaína a 2%⁸. Após a antissepsia da pele com polivinil pirrolidona iodo⁵, uma incisão fusiforme na base do umbigo foi realizada na pele e tecido subcutâneo com bisturi. A cavidade abdominal foi

⁶Riodeíne tópico p.v.p.i. 10%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁷I-Cath, Becton-Dickinson Ltd., Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁸Lidovet, Bravet Ltd., Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

aberta através 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 agulhado⁹. O tecido subcutâneo foi aproximado com fio absorvível de poliglactina 910 2-0 agulhado¹⁰ no padrão Cushing. Finalmente, a sutura de pele foi realizada com fio de náilon 2-0 agulhado¹⁰ no padrão Wolf¹¹.

A antibioticoterapia foi realizada com oxitetraciclina de longa ação¹² na dose de 10 mg/kg a cada 48 horas por via intramuscular, no total de 5 aplicações. Os curativos foram realizados com gaze embebida em solução de iodo povidine⁵. Os pontos foram removidos no décimo dia do pós-operatório.

3.5 Avaliação clínica e laboratorial

Antes de cada colheita foram aferidas as frequências cardíaca e respiratória, e temperatura retal. Os dados obtidos durante os exames clínico-laboratoriais foram utilizados para assegurar que os animais de ambos os grupos apresentaram variações dos parâmetros analisados dentro do esperado para a idade e espécie em estudo.

Após as colheitas as amostras de sangue colhidas em tubos contendo EDTA foram homogeneizadas até realização do hemograma em um contador automático de células, obtendo os valores de hemácias ($\times 10^9/L$), hematócrito (%), hemoglobina (g/dL), leucócitos ($\times 10^9/L$), linfócitos ($\times 10^9/L$), monócitos ($\times 10^9/L$) e granulócitos ($\times 10^9/L$).

3.6 Quantificação das concentrações de ativina A

⁹Ethibond Excel, Johnson & Johnson Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil.

¹⁰Vicryl II, Johnson & Johnson Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil.

¹¹Mononylon, Jonson & Jonson Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil.

¹²Terramicina LA 20%, Pfizer Ltda, Campinas, SP, Brasil.

As concentrações de ativina A foram quantificadas pelo teste ELISA sanduíche disponível comercialmente¹³ conforme descrito por Forbes et al. (2011), seguindo-se as instruções do fabricante. Foi utilizando um anticorpo primário biotinilado monoclonal de camundongo produzido contra ativina A de ratos/humanos/camundongo expressada em células-CHO ligado a placas cobertas com estreptavidina. O anticorpo secundário utilizado foi um anticorpo monoclonal de camundongo produzido contra a subunidade β A da ativina A, conjugada com peroxidase de rábano (HRP). A ativina A humana recombinante foi usada como padrão e as amostras foram corridas em duplicata. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA a 450 nm e a coloração da reação foi proporcional à quantidade da ativina na amostra.

3.7 Análise estatística

As concentrações plasmática e peritoneal de ativina A foram analisadas pela Análise de Variância com medidas repetidas no tempo, utilizando o procedimento Mixed do SAS (Statistical Analysis System) para comparar grupos e momentos e comparações múltiplas das médias com o LSMEANS (Least Squares Means), ajustado pelo teste de Tukey. Foi realizada a análise de correlação linear de Pearson entre as concentrações de ativina A no plasma e líquido peritoneal, por grupo em cada momento. Os dados foram testados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

¹³Quantikine Activin A ELISA, R&D Systems Inc., Cotia, SP, Brasil

IV RESULTADOS

Os dados das concentrações plasmáticas e peritoneais de ativina A encontram-se descritos na Tabela 1.

Não foram observadas alterações nas concentrações plasmáticas de ativina A ao longo do tempo nos animais do grupo controle ($p = 0,0251$). Entretanto, no grupo experimental, houve aumento das concentrações de ativina A 15 dias após a herniorrafia em relação ao momento basal ($p = 0,1680$).

As concentrações plasmáticas de ativina A do grupo experimental estavam diminuídas em relação aos animais do grupo controle no 3º dia após a cirurgia ($p = 0,0453$). Contudo, estas concentrações aumentaram após 15 dias nos animais submetidos à herniorrafia em relação aos animais do grupo controle ($p = 0,0002$).

As concentrações de ativina A no líquido peritoneal não se alteraram ao longo do tempo em relação ao momento basal em ambos os grupos ($p = 0,4953$). Entretanto, houve aumento das concentrações de ativina A 5 dias após a herniorrafia no grupo experimental em relação ao grupo controle ($p = 0,0436$).

Encontrou-se uma correlação negativa ($r = - 0,86$) significativa ($p = 0,03$) entre as concentrações plasmáticas e no líquido peritoneal 3 dias após a herniorrafia nos animais do grupo experimental.

Quando os compartimentos foram comparados (sangue periférico e líquido peritoneal), observou-se que as concentrações de ativina A no líquido peritoneal foram significativamente maiores que aquelas concentrações séricas tanto no grupo experimental ($p < 0,0001$) quanto no grupo controle ($p < 0,0001$).

Tabela 1 – Concentrações plasmática e peritoneal de ativina A (pg/mL), de bezerros não portadores de hérnia umbilical (Grupo Controle) e de bezerros portadores de hérnia umbilical (Grupo Experimental), antes (dia 0) e após herniorrafia (dias 1, 3, 5, 7 e 15). Os dados representam média ($\bar{x}$) e desvio padrão (S)

	Sangue (plasma)				Líquido Peritoneal			
	Grupo		Grupo		Grupo		Grupo	
	Controle		Experimental		Controle		Experimental	
Dias	n	$\bar{x} \pm S$	n	$\bar{x} \pm S$	n	$\bar{x} \pm S$	n	$\bar{x} \pm S$
0	7	0,04 ± 0,02	8	0,04 ± 0,01 ^b	8	0,35 ± 0,13 [†]	8	0,41 ± 0,14 [*]
1	9	0,04 ± 0,02	8	0,05 ± 0,01	8	0,33 ± 0,13 [†]	9	0,40 ± 0,09 [*]
3	9	0,05 ± 0,01 ^A	8	0,03 ± 0,01 ^B	7	0,35 ± 0,08 [†]	8	0,40 ± 0,07 [*]
5	8	0,04 ± 0,01	8	0,04 ± 0,01	5	0,34 ± 0,07 ^{B†}	8	0,46 ± 0,11 ^{A*}
7	8	0,04 ± 0,01	9	0,04 ± 0,01	5	0,31 ± 0,08 [†]	5	0,41 ± 0,15 [*]
15	8	0,03 ± 0,01 ^B	8	0,06 ± 0,02 ^{Aa}	7	0,32 ± 0,14 [†]	7	0,40 ± 0,12 [*]

^{Aa} Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

n Número de animais avaliados.

[†] No grupo controle, o valor para esta variável no líquido peritoneal é significativamente diferente do valor no sangue no mesmo momento ($p < 0,05$).

^{*} No grupo experimental, o valor para esta variável no líquido peritoneal é significativamente diferente do valor no sangue no mesmo momento ($p < 0,05$).

V DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, observou-se que a presença da hérnia umbilical não foi estímulo suficiente para provocar alterações nas concentrações plasmática e peritoneal de ativina A. No momento da herniorrafia não foi encontrado nenhum tipo de alteração inflamatória no local da cirurgia e nem alterações de qualquer natureza nas alças intestinais (necrose, estrangulamento, encarceramento), que pudesse ser indicativa de um processo inflamatório pré-existente (POLÓ et al., 2013).

Apesar da paracentese seriada causar estímulo inflamatório mínimo, (PEIRÓ et al., 2009; POLÓ et al., 2013), este estímulo também não foi suficiente para causar alterações significativas na concentração de ativina ao longo do tempo em ambos os grupos.

A ativina A, tal como um fator multifuncional, desempenha um papel importante na resposta imune de fase aguda e os seus níveis de expressão estão aumentados em várias doenças inflamatórias como septicemia, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide (WANG, et al., 2013), úlceras gástricas, hepatite e dano experimental ao fígado, lesões por queimaduras, angina e insuficiência cardíaca, meningite, traumatismo crânio-encefálico, inflamação crônica do SNC, asma, infecção da placenta e pré-eclâmpsia (HEDGER et al., 2011).

A ativina A exerce um efeito pró-inflamatório no início da inflamação, especialmente em doses mais baixas, mas uma vez que a resposta inflamatória esteja em curso, ela pode agir opondo a sinalização inflamatória e a produção de mediadores inflamatórios (HEDGER et al., 2011). A ativina tem um perfil bifásico (PHILLIPS, 2005; PHILLIPS et al., 2009) consistente com uma liberação inicial de material pré-armazenado a partir de células responsivas (fase inicial), seguido pela síntese *de novo* (fase secundária) composta de material recém sintetizado (PHILLIPS et al., 2009), onde

queratinócitos supra basais da epiderme da ferida hiperproliferativa seriam responsáveis pelo segundo pico de expressão (SULYOK et al., 2004).

A diminuição da concentração plasmática de ativina A três dias após a herniorrafia indica que houve um recrutamento da proteína pré-formada, que migrou da circulação periférica para a cavidade abdominal, coincidindo com o início da fase proliferativa da cicatrização a qual envolve a angiogênese, formação de tecido fibroso e de granulação, epitelização e contração da ferida (AUER; STICK, 2011), quando monócitos atingem a ferida e diferenciam-se em macrófagos (GURTNER et al., 2009).

As lesões na pele iniciam uma série de eventos biológicos que visam a reconstrução do tecido danificado. Entre elas estão a proliferação, diferenciação e migração de vários tipos de células, a produção e a deposição das proteínas da matriz extracelular, bem como a remodelação da matriz (MARTIN, 1997; SULYOK et al., 2004). Histologicamente, esses processos são bem descritos, mas os mecanismos moleculares envolvidos só foram parcialmente identificados, resultando que a maioria dos genes que alteram a expressão de ativina A após a lesão são funcionalmente importantes para o processo de reparação tecidual (SULYOK et al., 2004). Portanto, o aumento desta proteína na cavidade abdominal no 5º dia do pós-operatório é condizente com o papel da ativina na cicatrização de feridas, onde após a lesão cutânea, a expressão da ativina é regulada por fibroblastos, macrófagos, e queratinócitos (SULYOK et al., 2004; WERNER; ALZHEIMER, 2006)

Estes dados são consistentes com a ideia de que a elevação dos níveis de ativina observadas durante procedimentos cirúrgicos está principalmente relacionada com a liberação induzida desta proteína, com isso uma explicação mais plausível para o aumento da concentração de ativina A plasmática observado 15 dias após a cirurgia no grupo experimental em comparação com o grupo controle e com o momento basal poderia ser justificada pela liberação de moléculas recém sintetizadas.

Em estágios avançados após a lesão de pele, tanto ativina quanto TGF β são altamente expressos em queratinócitos supra basais de re-diferenciação

da ferida na epiderme sendo assim os autores propõem que essas proteínas limitam a capacidade proliferativa dos queratinócitos da ferida (SULYOK et al., 2004). Recentemente foi demonstrado que a ativina A aumenta os níveis do mRNA de colágeno tipo I em fibroblastos de rim de ratos (MUNZ et al., 1999). A ativina tem um efeito modesto sobre a síntese de proteoglicanos e colágeno em culturas de condrócitos bovinos (PHILLIPS, 2005). Em camundongos adultos foi encontrada uma grande indução da expressão da ativina A um dia após a lesão de pele, e níveis altos persistiram durante a primeira semana após a lesão (MUNZ et al., 1999).

As vias de sinalização que medeiam as funções da ativina na ferida cutânea ainda são desconhecidas, porém os resultados obtidos nos últimos anos demonstram um papel essencial de ativina na reparação de feridas e formação de cicatriz sugerindo fortemente que a ativina e seus antagonistas podem ser usados terapeuticamente para promover a cicatrização de feridas e prevenir a formação de cicatrizes, respectivamente (WERNER; ALZHEIMER, 2006).

VI CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo a determinar as concentrações plasmáticas e peritoneais de ativina A em bezerros portadores ou não de hérnia umbilical. Sendo assim:

- As concentrações plasmáticas e peritoneais de ativina A não se encontravam alteradas antes do procedimento cirúrgico em bezerros portadores de hérnia umbilical, indicando que a hérnia umbilical não foi estímulo suficiente para causar variações dessas concentrações e nem o estímulo cirúrgico em si, minimamente invasivo, em ambiente controlado, dessa forma as alterações encontradas em determinados momentos seriam decorrentes do processo cicatricial normal.
- Com os dados do estudo obtidos neste contexto a ativina não poderia ser usada isoladamente como um biomarcador e a avaliação de vários biomarcadores previamente estabelecidos proporcionariam um quadro mais completo dos eventos inflamatórios.
- Para avaliar alterações inflamatórias na cavidade abdominal foi observado que a análise do líquido peritoneal fornece melhores informações a respeito da concentração da proteína, sendo este o compartimento de eleição em comparação ao plasma. A paracentese seriada não foi capaz de causar alterações significativas na concentração de ativina A no líquido peritoneal.
- Foi possível estabelecer intervalos de referência da concentração para a ativina A tanto no líquido peritoneal quanto no plasma em bezerros jovens portadores ou não de hérnia umbilical.
- A observação de uma correlação negativa encontrada no terceiro dia após a herniorrafia indica que o aumento das concentrações peritoneais de ativina A ocorreram devido sua migração do sangue periférico para a cavidade abdominal.

VII REFERÊNCIAS

ALEMAN-MUENCH, G.R.; SOLDEVILA, G. When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity. **Immunology and Cell Biology**, v.90, p.137-148, 2012.

ANDERSON, D.E. Surgical diseases of the neonate. **23rd World Buiatrics Congress**, Quebec city, Canada, 2004.

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

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

ANTSIFEROVA, M.; WERNER, S. The bright and the dark sides of activin in wound healing and câncer. **Journal of Cell Science**, v.125, p.3929-3937, 2012.

AUER, J.; STICK, J. **Equine surgery**. 4. ed. Saunders, 2011. p. 47-59.

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.

BREIT, S.; ASHMAN, K.; WILTING, J.; ROSSLER, J.; HATZI, E.; FOTSIS, T.; SCHWEIGERER, L. The N-myc oncogene in human neuroblastoma cells:

Down-regulation of an angiogenesis inhibitor identified as activin A. **Cancer Research**, v.60, p.4596-4601, 2000.

BURTON, S.; LOFSTEDT, J.; WEBSTER, S.; MCCONKEY, S. Peritoneal fluid values and collection technique in young, normal calves. **Veterinary Clinical Pathology**, v.26, n.1, p.38-44, 1997.

CAMPOS, A.C.L.; BRANCO, A.B.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v.20, n.1, p.51-58, 2007.

CHEN, Y.G.; LUI, H.M.; LIN, S.L.; LEE, J.M.; YING, S.Y. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. **Experimental Biology and Medicine**, v.227, n.2, p.75-87, 2002.

CHEN, Y.G.; WANG, Q.; LIN, S.L.; CHANG, C.D.; CHUNG, J.; YING, S.Y. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. **Experimental Biology and Medicine**, v.231, n.5, p.534-544, 2006.

COBELLIS, L.; REIS, F.M.; LUISI, S.; DANERO, S.; PIROTTI, L.; SCAMBIA, G.; PETRAGLIA, F. High concentrations of activin A in the peritoneal fluid of women with epithelial ovarian cancer. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v.11, n.4, p.203-206, 2004.

DONOVAN, G.A.; DOHOO, I.R.; MONTGOMERY, D.M.; BENNET, F.L. Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, v.34, n.1, p.31-46, 1998.

DUCHARME, N.G.; LOWE, J.E. Decision for surgery. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v.4, p.51-61, 1988.

DYSON, S. Review of 30 cases of peritonitis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.15, p.25-30, 1983.

FORBES, G.; SORICH, E.; NATH, L.C.; CHURCH, S.; SAVAGE, C.J.; BAILEY, S.R. Activin A as a novel biomarker of equine inflammatory abdominal disease: Preliminary findings. **The Veterinary Journal**, v.190, n.2, p.154-156, 2011.

GURTNER, G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M.T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v.15, p.314-321, 2009.

HARRISON, C.A.; WIATER, E.; GRAY, P.C.; GREENWALD, J.; CHOE, S.; VALE, W. Modulation of activin and BMP signaling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.225, p.19-24, 2004.

HAYASHI, Y.; MAESHIMA, K.; GOTO, F.; KOJIMA, I. Activin A as a critical mediator of capillary formation: interaction with the fibroblast growth factor action. **Endocrine Journal**, v.54, n.2, p.311–318, 2007.

HAYES, H.M. Congenital umbilical and inguinal hernias in cattle, horses, swine, dogs, and cats: risk by breed and sex among hospital patients. **American Journal of Veterinary Research**, v.35, p.839-842, 1974.

HEDGER, M.P.; KRETZER, D.M. The activins and their binding protein, follistatin - Diagnostic and therapeutic targets in inflammatory disease and fibrosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.24, p.285–295, 2013.

HEDGER, M.P.; WINNALL, W.R.; PHILLIPS, D.J.; KRETZER, D.M. The regulation and functions of activin and follistatin in inflammation and immunity. **Vitamins and Hormones**, v.85, p.255-297, 2011.

HUBNER, G.; BRAUCHLE, M.; GREGOR, M.; WERNER, S. Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease? **Laboratory Investigations**, v.77, p.311-318, 1997.

HUBNER, G.; HU, Q.; SMOLA H.; WERNER, S. Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. **Developmental Biology**, v.173, p.490-498, 1996.

JONES, K.L.; KRETZER, D.M.; PATELLA, S.; PHILLIPS, D.J. Activin A and follistatin in systemic inflammation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.225, p.119-125, 2004a.

JONES, K.L.; KRETZER, D.M.; CLARKE, I.J.; SCHEERLINCK, J-P.Y.; PHILLIPS, D.J. Characterisation of the rapid release of activin A following acute lipopolysaccharide challenge in the ewe. **Journal of Endocrinology**, v.182, p.69-80, 2004b.

KEELAN, J.A.; ZHOU, R.L.; MITCHELL, M.D. Activin A exerts both pro- and anti-inflammatory effects on human term gestational tissues. **Placenta**, v.21, n.1, p.38-43, 2000.

KERSJES, A.W.; NÉMETH, F.; RUTGERS, L.J.E. **Atlas of large animal surgery**. Williams & Wilkins, London/Baltimore, 1984. p.30.

KRETZER, D.M.; O'HEHIR, R.E.; HARDY, C.L.; HEDGER, M.P. The roles of activin A and its binding protein, follistatin, in inflammation and tissue repair. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.359, p.101-106, 2012.

KIMURA, E.T.; MATSUO, S.E.; RICARTE-FILHO, J.C. TGF β , Ativina e sinalização SMAD em câncer de tiróide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.51, n.5, p.683-689, 2007.

MAIR, T.S.; SMITH, L.J. Survival and complication rates in 300 horses undergoing surgical treatment of colic. Part 1: short-term survival following a single laparotomy. **Equine Veterinary Journal**, v.37, p.296-302, 2005.

MANG, J.; MEI, C.L.; WANG, J.Q.; LI, Z.S.; CHU, T.T.; JIN-TING HE, J.T.; XU, Z.X. Endogenous protection derived from activin A smads transduction loop stimulated via ischemic injury in PC12 cells. **Molecules**, v.18, p.12977-12986, 2013.

MARINO, F.E.; RISBRIDGER, G.; GOLD, E. The therapeutic potential of blocking the activin signalling pathway. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.24, p.477-484, 2013.

MARTIN, P. Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v.276, p.75–81, 1997.

MICHEL, U.; EBERT, S.; PHILLIPS, D.; NAU, R. Serum concentrations of activin and follistatin are elevated and run in parallel in patients with septicemia. **European Journal of Endocrinology**, v.148, p.559-564, 2003.

MUKHOPADHYAY, A.; CHAN, S.Y.; LIM, I.J.; PHILLIPS, D.J.; PHAN, T.T. The role of the activin system in keloid pathogenesis. **American Journal of Physiology**, v.292, p.1331-1338, 2007.

MUNZ, B.; HUBNER, G.; TRETTER, Y.; ALZHEIMER, C.; WERNER, S. A novel role of activin in inflammation and repair. **Journal of Endocrinology**, v.161, p.187-193, 1999.

MUNZ, B.; TRETTER, Y.P.; HERTEL, M.; ENGELHARDT, F.; ALZHEIMER, C.; WERNER, S. The roles of activins in repair processes of the skin and the brain. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.180, p.169-177, 2001.

NAZIFI, S.; DEHGHANI, S.; BARZEGAR, M.R. Evaluation of cellular and biochemical parameters of blood and peritoneal fluid following enterectomy in the goat. **Small Ruminant Research**, v.37, p.65-71, 2000.

PANGAS, S.A.; WOODRUFF, T.K. Activin signal transduction pathways. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.11, n.8, 2000.

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 peritoneal fluid from calves before and after umbilical herniorrhaphy. **American Journal of Veterinary Research**, v.70, p.423-432, 2009.

PHILLIPS, D.J. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, p.1-16, 2005.

PHILLIPS, D.J. New developments in the biology of inhibins, activins and follistatin. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.12, n.3, p. 94-96, 2001.

PHILLIPS, D.J.; KRETZER, D.M.; HEDGER, M.P. Activin and related proteins in inflammation: Not just interested bystanders. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.20, p.153-164, 2009.

POLÓ, T.S. **Concentrações plasmáticas e peritoneal da proteína de fase aguda HMGB1 em bezerros portadores ou não de hérnia umbilical**. 2013. 56f. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2013.

POULAKI, V.; MITSIADES, N.; KRUSE, F.E.; RADETZKY, S.; ILIAKI, E.; KIRCHHOF, B.; JOUSSEN, A.M. Activin A in the regulation of corneal

neovascularization and vascular endothelial growth factor expression. **American Journal of Pathology**, v.164, n.4, p. 2004.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 56-59,102-136.

RINGS, D.M. Umbilical hernias, umbilical abscesses, and urachal fistulas. Surgical considerations. **Veterinary Clinical of North America: Food Animal Practice**, v.11, n.1, p.137-149, 1995.

SMITH, B.P. **Medicina interna de grandes animais**. 3. ed. Barueri-SP: Manole, 2006. p.1500.

SUGINO, H.; SUGINO, K.; HASHIMOTO, O.; SHOJI, H.; NAKAMURA, T. Follistatin and its role as an activin-binding protein. **The Journal of Medical Investigation**, v.44, p.1-14, 1997.

SULYOK, S.; WANKELL, M.; ALZHEIMER, C.; WERNER, S. Activin: an importante regulator of wound repair, fibrosis, and neuroprotection. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.225, p.127-132, 2004.

WALTON, K.L.; MAKANJI, Y.; HARRISON, C.A. New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.359, p.2-12, 2012.

WANG, D.H; WANG, Y.N.; GE, J.Y.; LIU, H.Y.; ZHANG, H.J.; QI, Y.; LIU, Z.H.; CUI, X.L. Role of activin A in carbon tetrachloride-induced acute liver injury. **World Journal of Gastroenterology**, v.19, n.24, p.3802-3809, 2013.

WANG, Y.; CUI, X.; TAI, G.; GE, J.; LI, N.; CHEN, F.; YU, F.; LIU, Z. A Critical Role of Activin A in Maturation of Mouse Peritoneal Macrophages in vitro and in vivo. **Cellular & Molecular Immunology**, v.6, n.5, p.387-392, 2009.

WEAVER, A.D.; JEAN, G.S.; STEINER, A. **Bovine surgery and lameness**. 2. ed. Blackwell, 2005. p.122.

WERNER, S.; ALZHEIMER, C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. **Cytokine and Growth Factor**, v.17, p.157-171, 2006.

WITTEK, T.; GROSCHE, A.; LOCHER, L.; ALKAASSEM, A.; FÜRL, M. Biochemical constituents of peritoneal fluid in cows. **Veterinary Record**, v.166, n.1, p.15-19, 2010.

YNDESTAD, A.; LARSEN, K.O.; ØIE, E.; UELAND, T.; SMITH, C.; HALVORSEN, B.; SJAASTAD, I.; SKJØNSBERG, O.H.; PEDERSEN, T.M.; ANFINSEN, O.G.; DAMÅS, J.K.; CHRISTENSEN, G.; AUKRUST, P.; ANDREASSEN, A.K. Elevated levels of activin A in clinical and experimental pulmonary hypertension. **Journal of Applied Physiology**, v.106, n.4, p.1356-1364, 2009.