



# **PROTEÍNAS DE FASE AGUDA COMO SINALIZADORES DE ENFERMIDADE UTERINA E A ATUAÇÃO DE HORMÔNIO REPRODUTIVOS SOBRE A FUNÇÃO IMUNE**

Pelotas, 10 de maio de 2017

# Painelistas



Andressa Stein Maffi  
Médica Veterinária  
Doutoranda em zootecnia



Kemeli Prestes  
Graduanda em Agronomia



Jordani Cardoso  
Graduanda em Zootecnia

# Escolha do tema e artigos

- ✓ Projeto indução de lactação em novilhas
- ✓ Número elevado de animais apresentaram secreção vaginal (2 e 3)
- ✓ Já é conhecido que alguns hormônios tem efeito imunossupressor
- ✓ Uma forma de identificar esse efeito sobre a imunidade é através das proteínas de fase aguda
- ✓ Ainda não existem trabalhos com vacas induzidas relacionados a imunidade

Proteínas de  
fase aguda

Hormônios pós-  
parto

# Doença uterina

Maior número de  
IA/ concepção

Aumento dos dias  
em aberto

Aumento dos custos  
com tratamentos



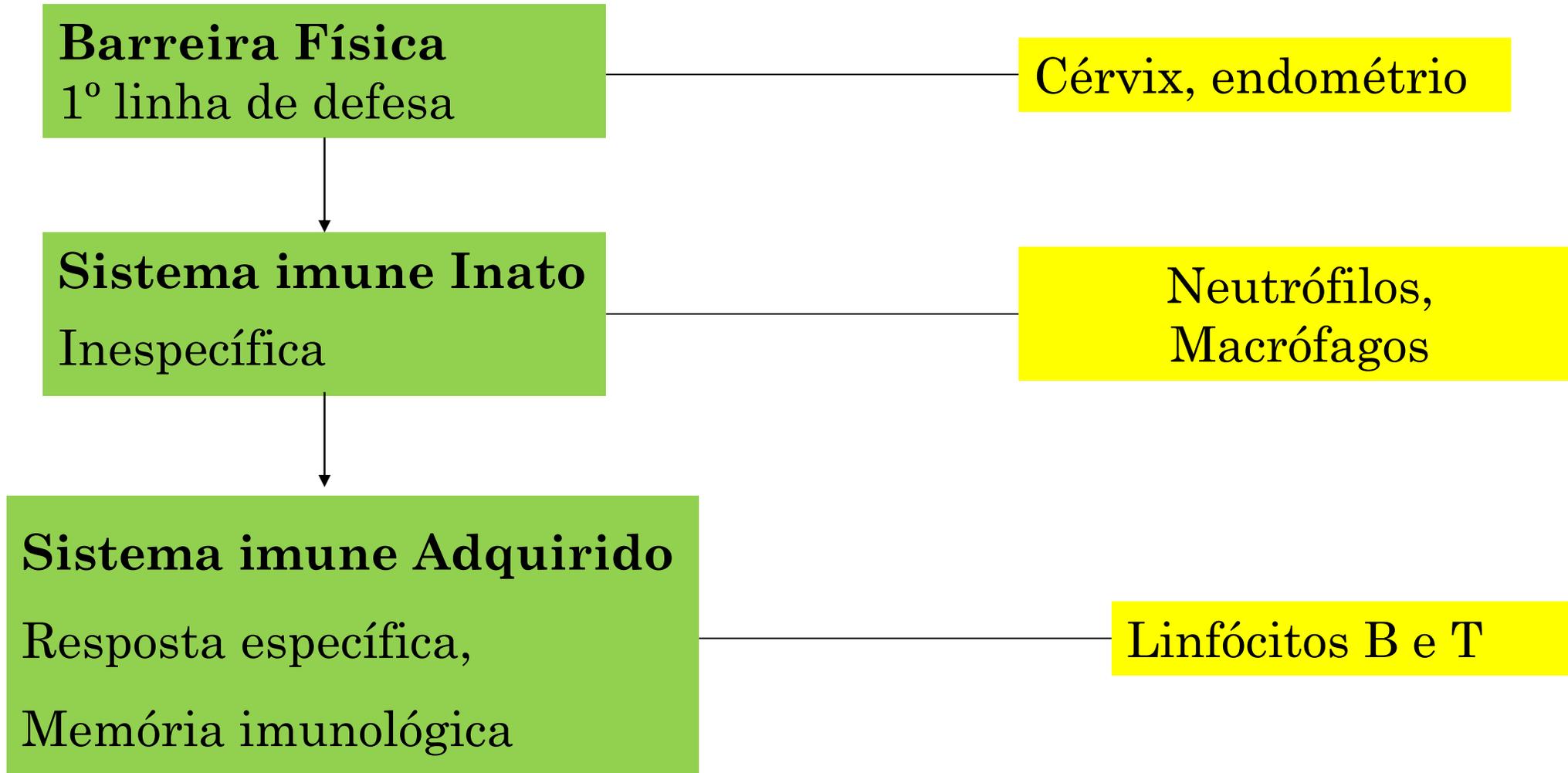
Menor produção de  
leite

Descarte dos  
animais

**Patogênicidade dos  
microorganismos**

**Capacidade  
imune**

# Sistema Imune útero



# Invasão Microbiana

PAMPs

DAMPs

Receptores de Reconhecimento Padrão

Células sentinelas

Moléculas vasoativas

Moléculas antibacterianas

Citocinas

**Produção de proteínas de fase aguda**

Neutrófilos

Recrutamento

Fagocitose

Macrófagos

Apoptose

Remoção de células apoptóticas

São os maiores fagócitos em bovinos

**Reparo tecidual / cicatrização**

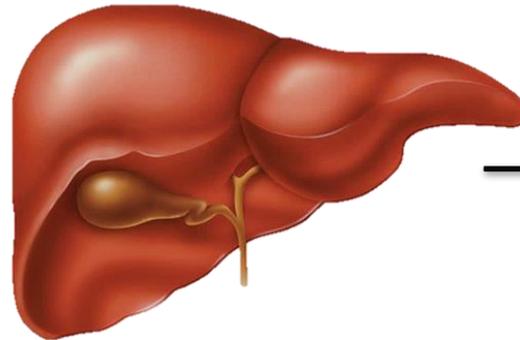
# Proteínas de fase aguda

Sua concentração plasmática é alterada rapidamente em processos inflamatórios, traumas cirúrgicos e estresse

A concentração circulante destas proteínas está relacionada à gravidade da disfunção orgânica

Macrófagos  
e monócitos

Liberação de citocinas:  
interleucina-1 (IL-1),  
interleucina-6 (IL-6) e fator  
de necrose tumoral I (FNT-I).



**PROTEINAS DE  
FASE AGUDA**

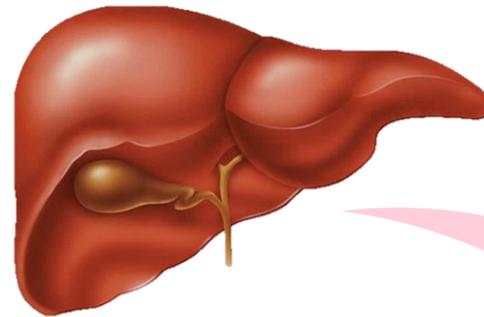
# Proteínas de fase aguda

+

Inflamação

-

Ceruboplasmina  
Haptoglobina  
Fibrinogênio  
Lactoferrina



Albumina  
Transferrina  
Paraoxanase

Alterações nos níveis de algumas dessas proteínas pré-parto são correlacionadas com a ocorrência de enfermidades pós-parto

# Imunidade Inata- Período de transição

Gestante  
Não lactante

Parto

Não Gestante  
Lactante

-21

0

21

- ✓ Redução da IMS
- ✓ Aumento de Cortisol

IMS= 9,6 Kg – 22Kg  
Ca= 9g-23g



- ✓ Redução da Glicose
- ✓ Redução da insulina
- ✓ Aumento de Corpos

Cetônicos

**BEN**

Alterações Metabólicas, Imunológicas e Hormonais

# Imunidade Inata- Imunossupressão



**NEFA**

**BHBA**



Redução da fagocitose

Redução do número e da proliferação de linfócitos

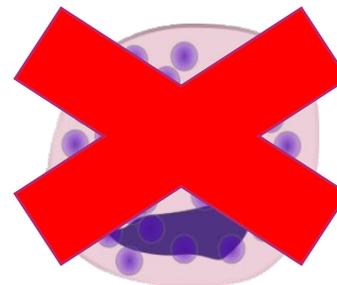
Maior ocorrência de enfermidades pós-parto (Metrite, endometrite, mastite)



**Calcio**

**Glicose**

**Vit**



# Imunidade Inata- Imunossupressão



## Protocolo Convencional

$E_2$ = 30ml- 20ml (30mg- 20mg)  
 $P_4$ =2 ml (0,30 g (300mg)  
PGF<sub>2</sub> =2 ml (0,50 mg)  
Corticoide= 20 ml (40mg)



### Níveis fisiológicos

Cortisol- 1 mmol/L

Progesterona- 4ng- 17/mL

Estradiol- 0,005-0,155 ng/ml

### Vacas Induzidas

Cortisol- 1.81 mmol/L

Progesterona- 300ng/mL

Estradiol- 30 ng/mL

# Imunidade Inata- Hormônios

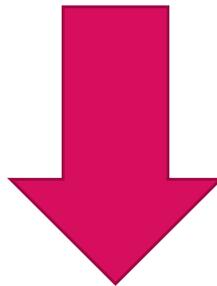
## Estradiol



Fluxo sanguíneo  
Chegada de células de defesa  
Produção de muco  
Contrações miométriais  
Atividade de polimorfonucleares  
Número de leucócitos, granulócitos e neutrófilos

**Redução de linfócitos**  
**Supressão de neutrófilos**  
**Aumento da produção de cortisol**

## Progesterona



Fluxo sanguíneo  
Chegada de células de defesa  
Produção de muco  
Contrações miométriais  
Produção de prostaglandinas (PGF2 $\alpha$ )

# Resumindo

NEFA  
CORTISOL  
HORMÔNIOS (Progesterona, estradiol ??)

Supressão

Sistema imune

Sinalização

Proteínas de fase aguda

Maior ocorrência de  
enfermidades Pós-parto

Mastite  
Metrite  
Endometrite

# Artigo 1

Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection

A. Schneider<sup>a</sup>, M.N. Corrêa<sup>a</sup>, W.R. Butler<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Center for Research, Teaching and Extension in Animal Science (NUPEEC), Veterinary College, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

<sup>b</sup>Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA

Revista: Research in Veterinary Science

Ano de publicação: 2013

# Doenças uterinas

Infecções uterinas ocorrem no pós-parto recente

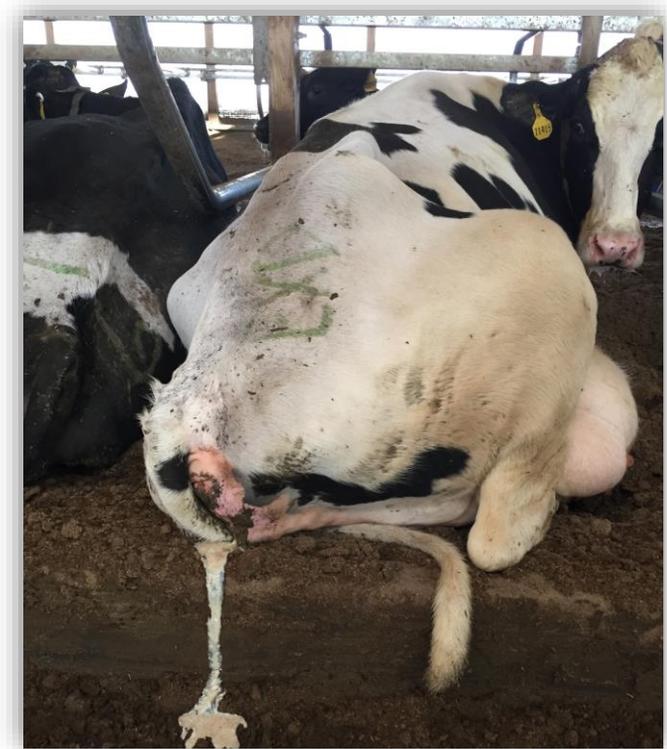
-**Metrite** e Endometrite

Até os 21 dias pós- parto

Presença de conteúdo uterino

Odor fétido

Aumento de temperatura corporal



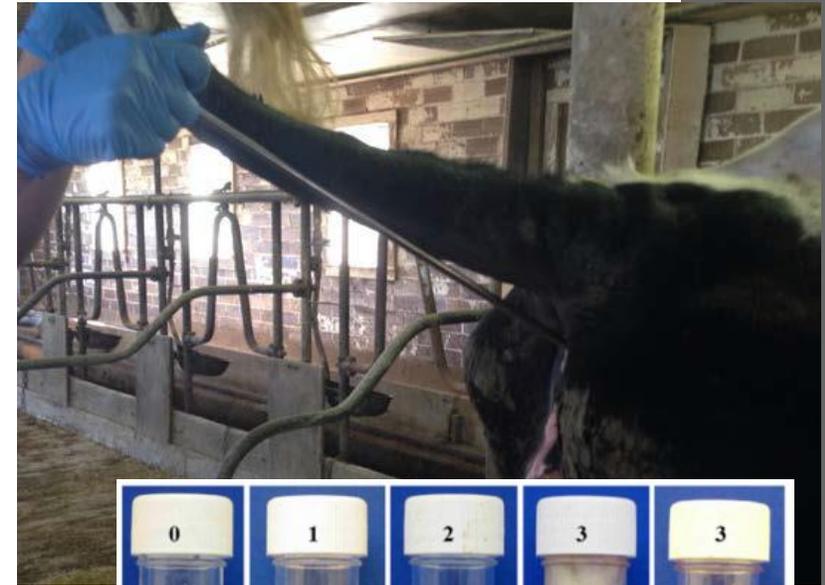
# Diagnóstico



Ultrasson



Vaginoscopia



Metricheck



Diagnóstico Precoce

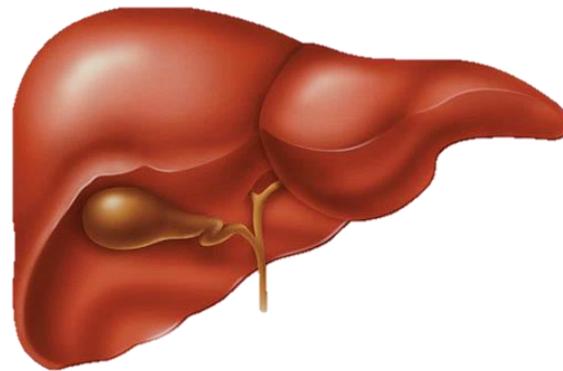
**Proteínas de fase aguda**

# Proteínas de fase aguda

Traumatas, fatores estressantes  
processos inflamatórios

+

Ceruboplasmina  
Globulina  
**Haptoglobina**  
Fibrinogênio



-

**Albumina**  
Transferrina  
**Paraoxanase**

Alterações nos níveis de algumas dessas proteínas pré-parto são correlacionadas com a ocorrência de enfermidades pós-parto

## **Haptoglobina**

- Glicoproteína
- Meia vida- 2-4 dias
- Liga-se a hemoglobina
- Aumenta para valores maiores que 2 g/L dentro de dois dias após a infecção
- Retorna ao normal duas semanas após a cura

## **Paraoxanase**

- Liga-se ao HDL
- Efeito antioxidante

## **Albumina**

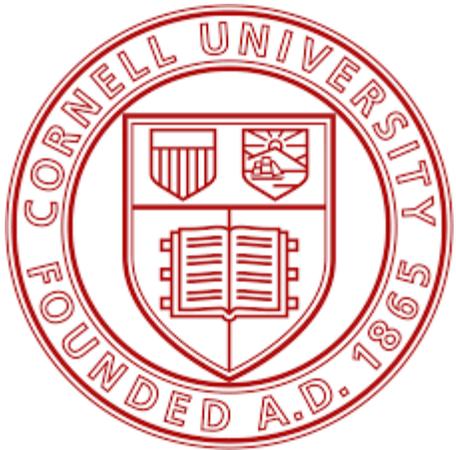
- Proteína não glicosilada
- Representa 35% a 50% das proteínas séricas
- Em processos agudos é aproveitada pelos hepatócitos para produção de proteínas positivas

# Objetivos

Monitorar o padrão de alterações entre proteínas de fase aguda (paraoxonase, albumina e haptoglobina) durante o período periparto de vacas saudáveis diagnosticado com infecção uterina no período pós-parto



# Materiais e métodos



31 vacas da raça holândes

Sistema free-stall



Diagnóstico de Infecção uterina

- 2 dias consecutivos com secreção vaginal e febre
- Primeira e segunda semana pós-parto

Saudáveis (16)

Doentes (15)  
(8 primíparas, 7 multíparas)

# Materiais e métodos

Coleta de sangue



**Centrifuga**

2800 g  
20 min



**Eppendorf**

-20 °C

Análises  
Albumina, Paraoxanase,  
Haptoglobina, NEFA,  
BHBA



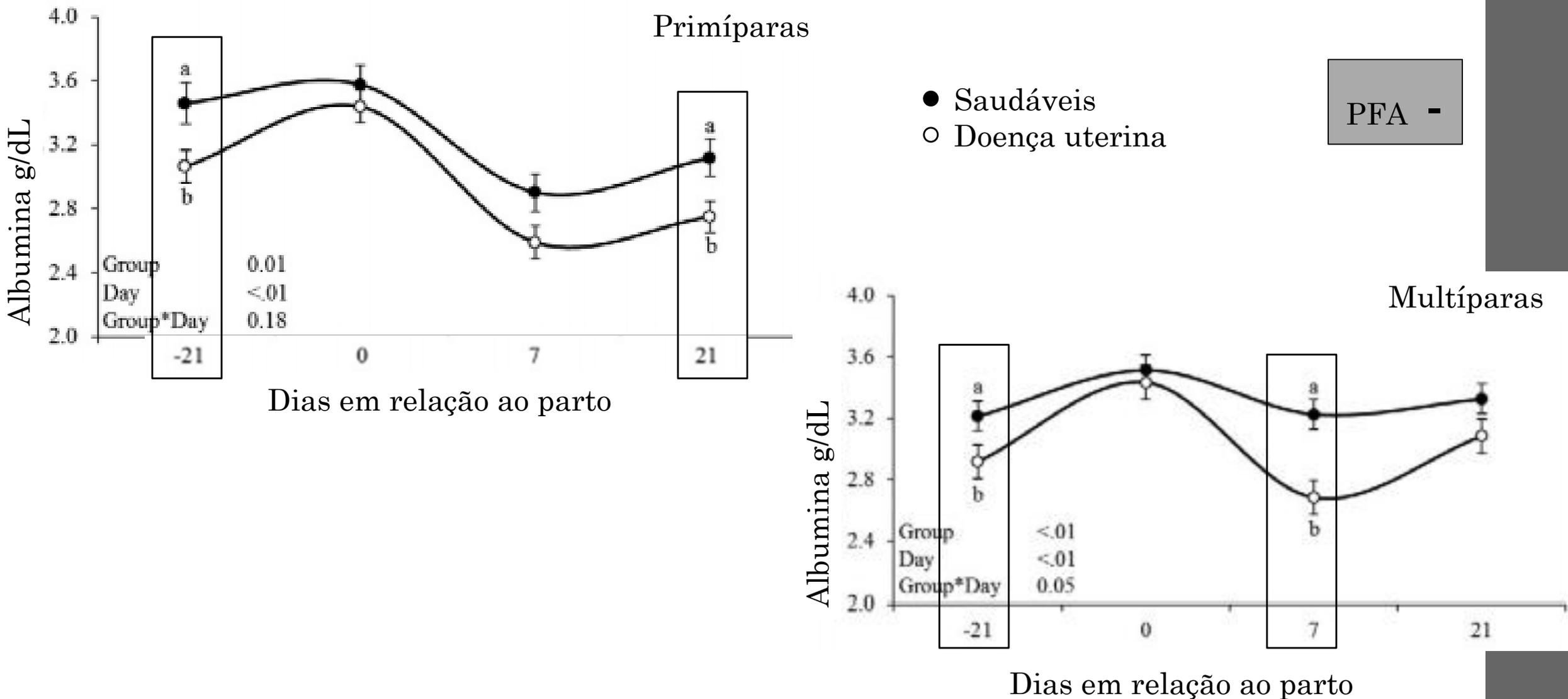
# Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2001).

Análise de medidas repetidas foi utilizada para avaliar os níveis das PFA ao longo do tempo .

# Resultados

Fig 1. Concentrações séricas de albumina (g / dL ) em vacas diagnosticadas com infecções uterinas ou saudáveis acompanhadas dos 21 dias pré-parto até 21 dias pós- parto.



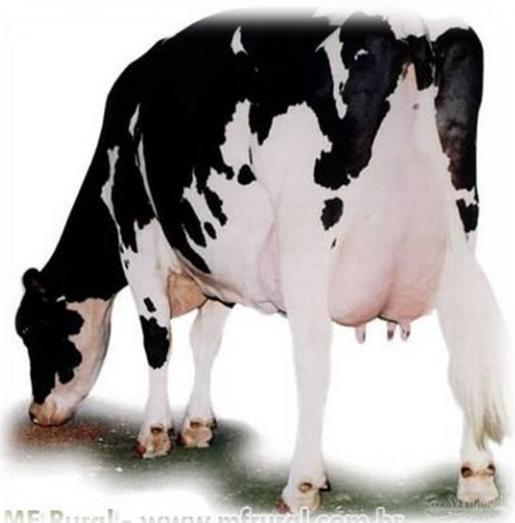
# Discussão

Pré parto

**Aumento do cortisol**

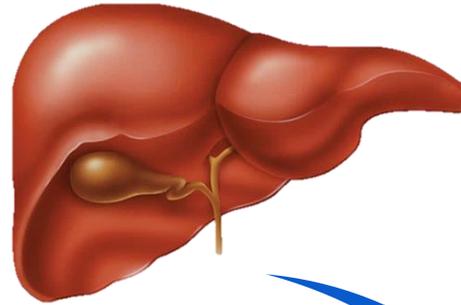
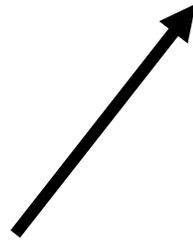
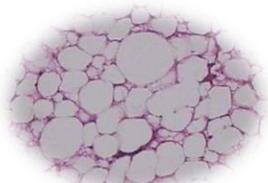
**Alterações hormonais**

**Redução da ingestão de  
matéria seca**



ME Rural - www.mfrural.com.br

**Lipólise**



**Acumulo de Ácidos  
Graxos**



**Produção de  
Albumina**

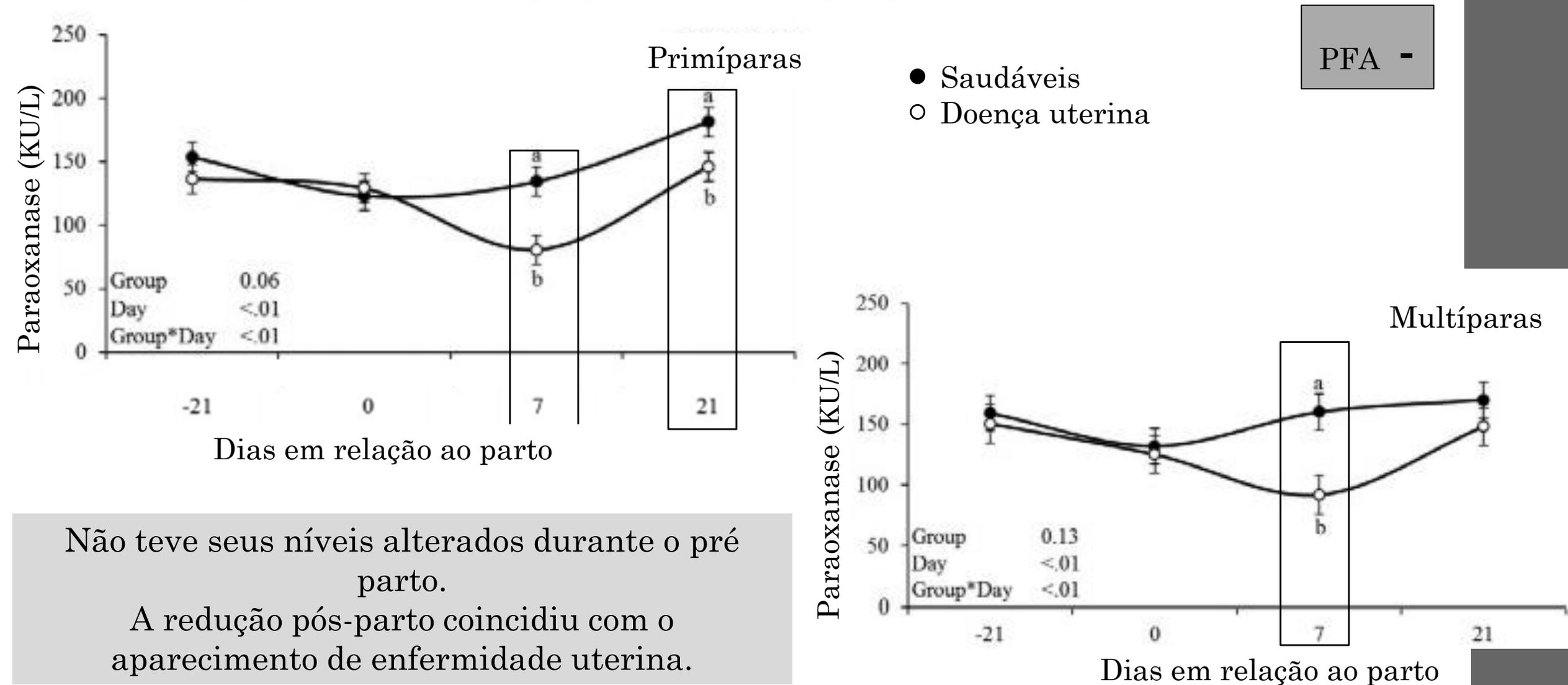
Porém nesse estudo não houve diferença nos níveis circulantes de NEFA e BHBA.

Possíveis causas: degradação para formação de outras proteínas

Degradação para energia

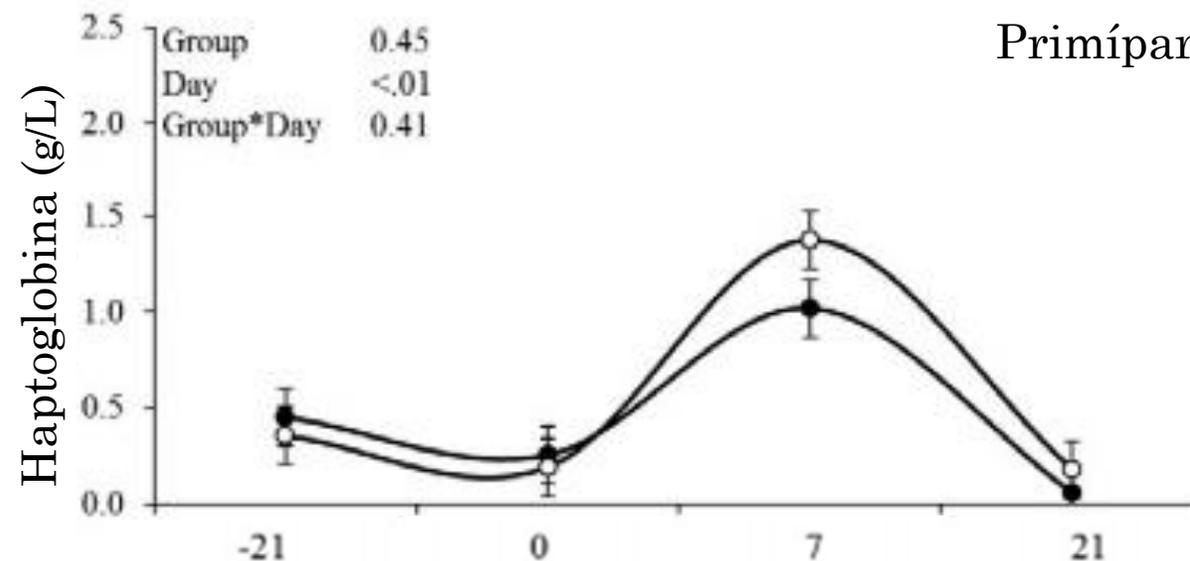
# Resultados e discussão

Fig 2. Concentrações séricas de Paraoxonase (KU / L) em vacas diagnosticadas com infecções uterinas ou saudáveis acompanhadas dos 21 dias pré-parto até 21 dias pós- parto.



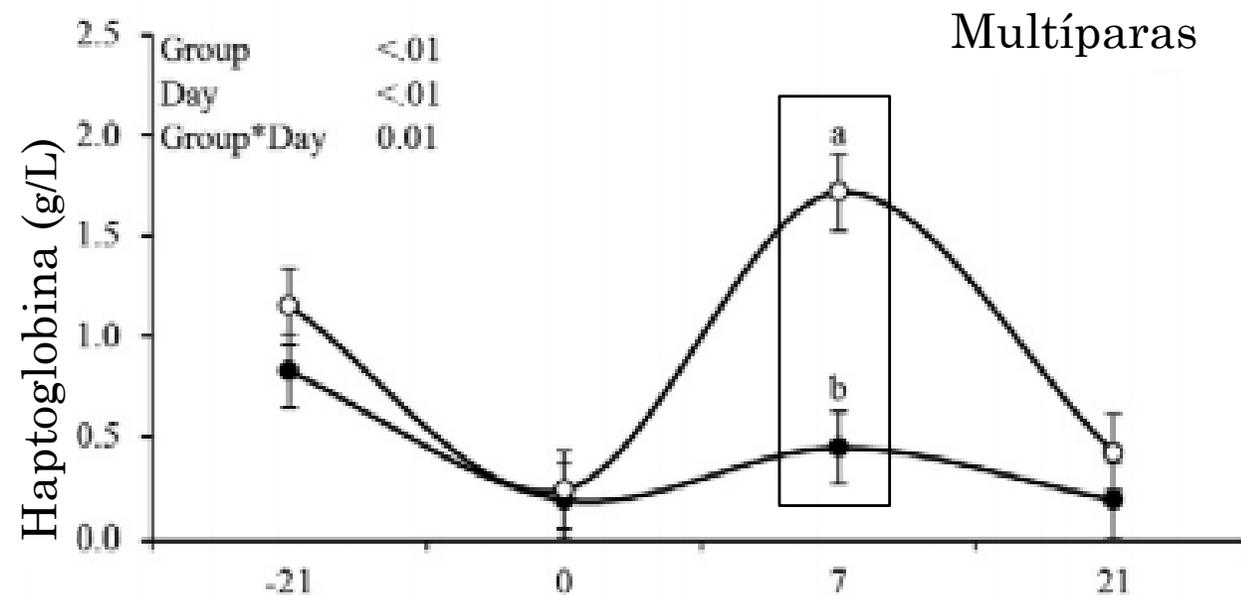
# Resultados e discussão

Fig 1. Concentrações séricas de Haptoglobina (g / L ) em vacas diagnosticadas com infecções uterinas ou saudáveis acompanhadas dos 21 dias pré-parto até 21 dias pós- parto.



PFA +

Não houve diferença nos níveis pré-parto. Níveis elevados em vacas **primíparas saudáveis** também foram observados no pós parto.



# Conclusão

- Esses resultados sugerem que, das PFA estudadas, a albumina é o indicador mais sensível do estado inflamatório e diagnóstico futuro da doença uterina.
- E pode ser uma ferramenta útil quando medida dentro de 3 semanas antes do parto para identificar vacas em risco de desenvolver doenças uterinas.

# Artigo 2

## **Relationships between follicular fluid steroid concentrations and uterine infections in ovarian cystic cows**

**Mehdi Heidari<sup>1</sup> • Mojtaba Kafi<sup>1</sup> • Azizollah Khodakaram-Tafti<sup>2</sup> •  
Abdollah Derakhshandeh<sup>3</sup> • Abdollah Mirzaei<sup>1</sup>**

Revista: Comparative Clinical Pathology

Ano de publicação: 2016

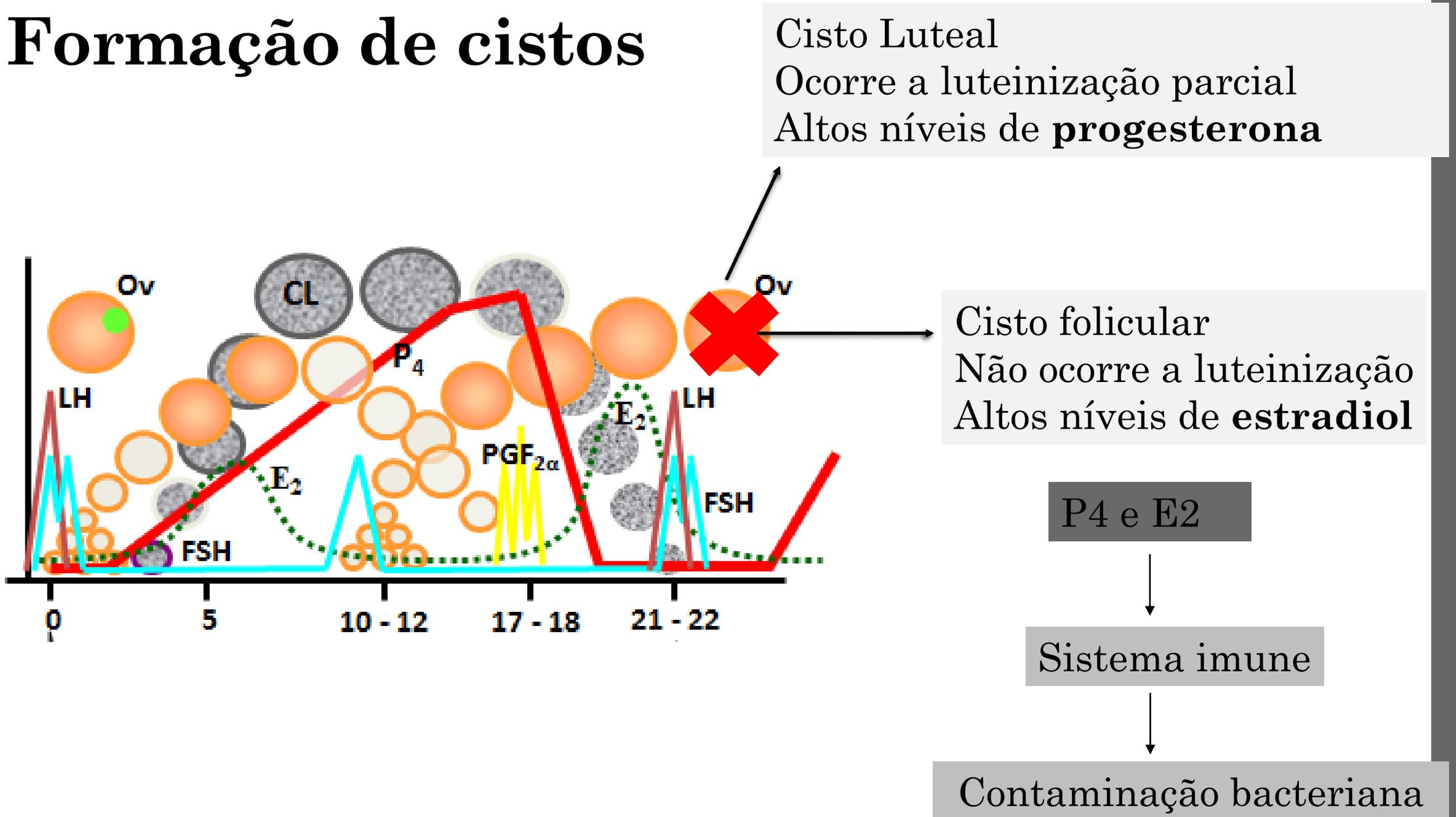
# Introdução

## Cistos

- Características: Estrutura com mais de 20 mm
- Tipos: Follicular ou luteal
- Diagnóstico: Ultrasson, ou palpação (estrutura presente no ovário por mais de 10 dias)
- Período de ocorrência: 20-150 dias pós parto
- Causas: Alterações na liberação de hormônios que controlam o ciclo estral

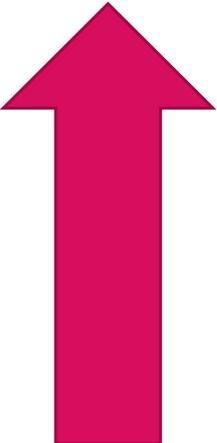


# Formação de cistos

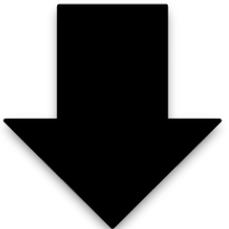


# Relembrando o papel dos hormônios na imunidade uterina

## Estradiol



Fluxo sanguíneo  
Chegada de células de defesa  
Produção de muco  
Contrações miométriais  
Atividade de polimorfonucleares



Proliferação  
bacteriana

## Progesterona



Fluxo sanguíneo  
Chegada de células de defesa  
Produção de muco  
Contrações miométriais  
Produção de prostaglandinas



Proliferação  
bacteriana



# Objetivo

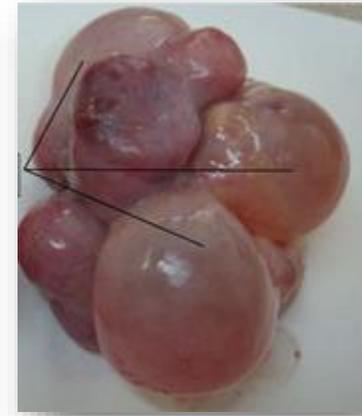
Determinar as relações entre infecções bacterianas uterinas, concentrações de esteroides do fluido folicular e tipo de cistos ovarianos em vacas leiteiras.



# Materiais e Métodos



21 Tratos genitais



+ 17 mm  
Sem CL



Figure 5. Vaginal discharge scoring for Metricheck. (Sheldon et al., 2005)



# Materiais e Métodos

## Bacteriologia

Swab com cotonete estéril

Semeado nos meios Agar Sangue e agar MacConkey

Temperatura de 37°C, ambiente aeróbio

Isolamento de bactérias aeróbias e aeróbias facultativas

## Histopatologia

Tecidos dos cistos foram coletados

Fixadas em formalina 10% e embebidas em parafina

Cistos foliculares: Paredes < 5 mm

Cistos luteais: Paredes > 5mm



Cisto folicular



Cisto luteal

# Materiais e Métodos

## Análise hormonal



Aspiração Cistos



Aspiração folículos



Centrifuga

1500rpm  
15 min

Análises  
Progesterona e Estradiol

10 Cistos foliculares  
11 Cistos luteais  
8 folículos normais



Eppendorf

-20 °C

# Análise estatística

A análises estatísticas foram realizadas utilizando SPSS (versão 16, SPSS Inc, Chicago, IL).

Utilizou-se ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para determinar as concentrações de estradiol-17 $\beta$ , progesterona e razão de estradiol17 $\beta$  / progesterona.

# Resultados e discussão

Tabela 1. Concentração de esteróides dos fluidos císticos e foliculares

<b>Estrutura</b>	<b>Estradiol (ng/ml)</b>	<b>Progesterona ng/ml</b>	<b>E2/P4</b>
Cisto luteal	1.32±0.80a	337.50±49.50a	0.003±0.001a
Cisto folicular	103.93±18.02b	149.90±30.25b	0.97±0.33ab
<b>Sem cisto</b>	<b>180.61±57.69b</b>	<b>85.91±30.25b</b>	<b>2.73±0.95b</b>

Tabela 2. Proporção de **bactérias aeróbias** isoladas das amostras uterinas das vacas com cistos foliculares, luteais e sem cistos

Bactérias	Cisto folicular (n=10) Número (%)	Cisto luteal (n=11) Número (%)	Sem Cisto (n=8) Número (%)
<i>Escherichia coli</i>	5 (50)	7 (63)	0
<i>Proteus spp.</i>	0	2 (18)	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (10)	2 (18)	1 (12.5)
<i>Pasteurella spp.</i>	0	1 (9)	0
<i>Bacillus spp.</i>	2 (20)	2 (18)	0
<i>Micrococcus spp.</i>	0	3 (27)	0
<i>Listeria spp.</i>	1 (10)	1 (9)	0
<i>Staphylococcus spp. (total)</i>	8 (80)	8 (72)	2 (25)
<i>S. saprophyticus</i>	4 (40)	3 (27)	0
<i>S. hyocus</i>	5 (50)	3 (27)	1 (12.5)
<i>S. lentus</i>	1 (10)	2 (18)	1 (12.5)
<i>S. epidermidis</i>	3 (30)	4 (36)	0
<i>S. arlettae</i>	0	2 (18)	0
<i>S. capitis</i>	0	2 (18)	0
<i>Corynebacterium spp. (total)</i>	4 (40)	5 (45)	1 (12.5)
<i>C. bovis</i>	4 (40)	3 (27)	1 (12.5)
<i>C. kutscheri</i>	0	2 (18)	0

Cisto luteal  
52 bactérias

Cisto Folicular  
38 bactérias

Sem Cisto  
7 bactérias

Figura 1. Concentrações de estradiol-17 $\beta$  e relação E2 / P4 dos fluidos císticos e foliculares em vacas infectadas ou não com **bactérias gran-negativas**.

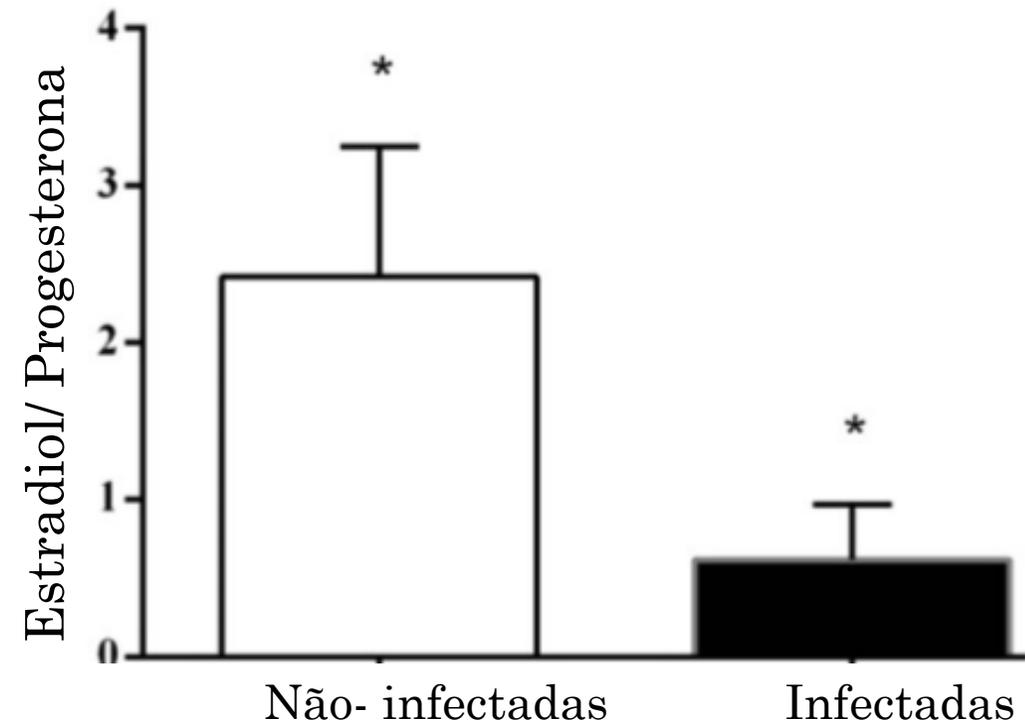
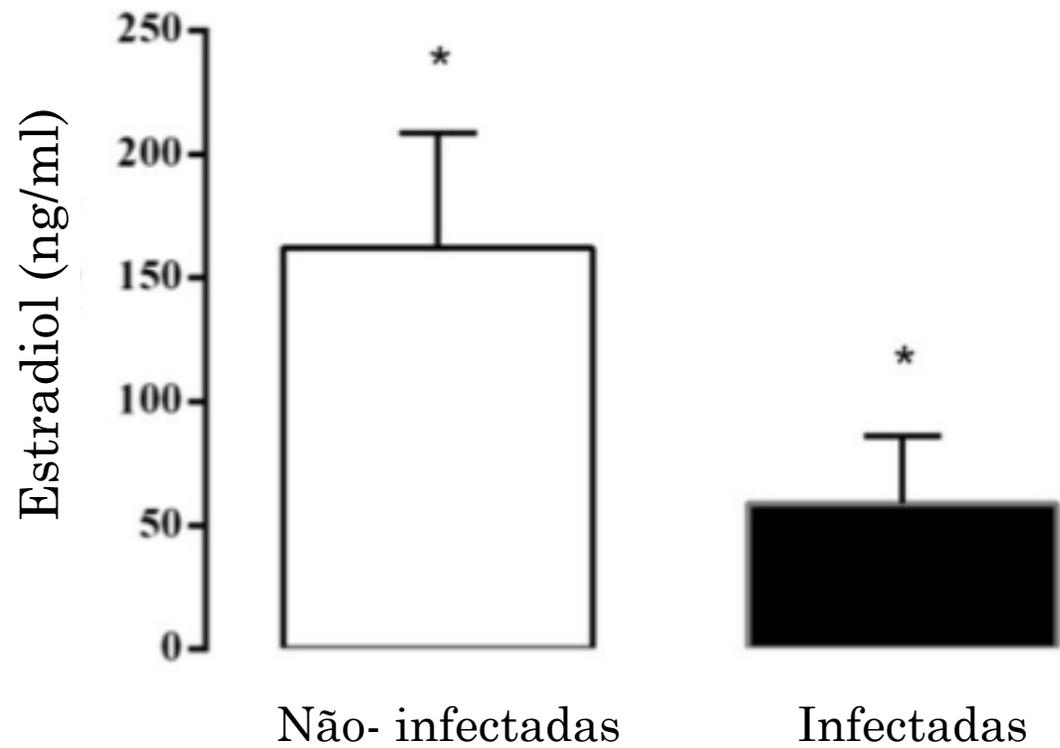


Tabela 3- Distribuição da infecção **bacteriana aeróbia** de acordo com a relação estradiol-17 $\beta$  / progesterona dos fluidos císticos e foliculares.

Razão estradiol/progesterona (variação)		
0.00–1.99	2–3.99	$\geq 4$
<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Pasteurella</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Listeria</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Listeria</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> spp.

# Conclusão

À medida que a razão E2 / P4 diminuem, aumentam significativamente a quantidade de espécies bacterianas no útero, independentemente da patogenicidade das bactérias.

Diferentes proporções de E2 / P4 no líquido follicular pode ser um fator pré-requisito para o estabelecimento de diferentes bactérias gram-negativas no meio uterino de vacas leiteiras.

# Conclusão

Evitar estresse excessivo

Reduzir os níveis de cortisol

NEFA

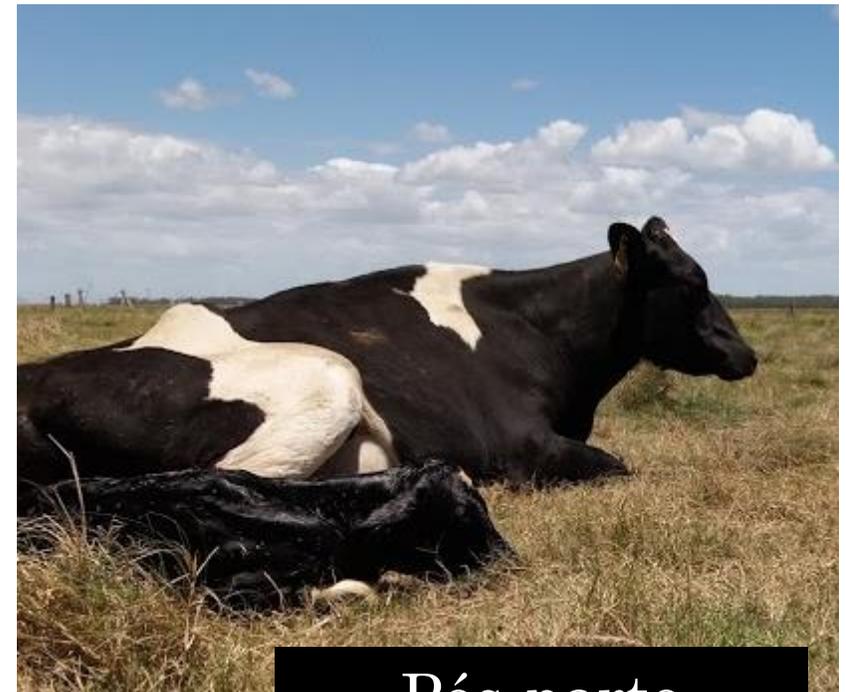
Reduzir níveis de NEFA

Reduzir os níveis de cortisol

Estimulo a uma ovulação precoce



Pré-parto



Pós-parto

# Conclusão



Ocorre Imunossupressão???

PFA são bons marcadores???

# OBRIGADA PELA ATENÇÃO!



Andressa Stein Maffi  
[andressamaffi@gmail.com](mailto:andressamaffi@gmail.com)  
Jordani Cardoso  
[Jordanicardoso.12@gmail.com](mailto:Jordanicardoso.12@gmail.com)  
Kemeli Prestes  
[Keke\\_melo@Hotmail.com](mailto:Keke_melo@Hotmail.com)