

# INFLUÊNCIA DA ENDOMETRITE SUBCLÍNICA NA ABUNDÂNCIA DE TRANSCRITOS DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ E IFN- $\gamma$ EM VACAS DE LEITE

Gabriela de Andrade Bruni

Diego Angelo Schmidt Poit

Guilherme Pugliesi

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brasil

[gabriela.bruni@usp.br](mailto:gabriela.bruni@usp.br)

## Objetivos

O objetivo deste estudo é avaliar a abundância de transcrito para as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  em células imunes de vacas gestantes com e sem endometrite subclínica, analisando se essa enfermidade pode alterar a expressão das mesmas.

## Métodos e Procedimentos

O experimento foi realizado numa fazenda comercial localizada em Arceburgo/MG, localizada a 125 km de Pirassununga/SP. Foram utilizadas 50 vacas da raça Holandesa, que estavam entre os dias 40 a 55 pós-parto.

No D-10 (sendo D0, dia da inseminação) os animais foram avaliados por meio do dispositivo *Metrichheck*®, que consiste numa haste de metal com uma extremidade de borracha para avaliação do muco cervicovaginal. Apenas os animais com escore do *Metrichheck*® menor que 3 foram usados e submetidos a técnica do *cytobrush*, que consiste no uso de um aparato com uma escova cervical acoplada a um aplicador universal de sêmen, para obtenção de células no lúmen uterino e para posterior contagem da proporção de células polimorfonucleares em relação ao total de células (imunes e epiteliais). Os animais com número de células maior ou igual a 4% eram considerados com ESC. Animais que entraram no projeto foram

submetidos a um protocolo hormonal para sincronização da ovulação. Para isso, os animais receberam 2 mg de benzoato de estradiol no D -10, 0,1 mg de gonadorelina e inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona. Sete dias após (D-3) os animais receberam uma aplicação de 0,526 mg de cloprostenol sódico. No D-2, receberam 0,5 mg de cipionato de estradiol e o dispositivo intravaginal foi removido. Por fim no D0, receberam uma segunda aplicação de gonadorelina e foi realizada a inseminação artificial em tempo fixo.

No D21, os animais foram avaliados por ultrassonografia transretal em modo Doppler colorido para avaliação da perfusão sanguínea no corpo lúteo. Além disso foram colhidas amostras de sangue pela veia caudal, utilizando 4 tubos heparinizados (*Vacutainer*®), para isolamento das células imunes (monócitos e linfócitos) para posterior determinação da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias por meio de qPCR.

No D32 foi feito diagnóstico de gestação confirmatório por ultrassonografia para identificação do embrião com batimentos cardíacos. Sendo assim, as vacas foram classificadas em 4 grupos, prenhes com ESC (ESC-P), prenhes saudáveis (S-P), não prenhes com ESC (ESC-NP) e não prenhes saudáveis (S-NP).

## Resultados

Os genes IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , independentemente da presença ou não de ESC, tenderam a ter uma maior expressão para animais prenhes do que animais não prenhes (Figuras 1 e 2). O status gestacional e a ESC não influenciaram a expressão gênica do IFN- $\gamma$  ( $P>0,05$ ).

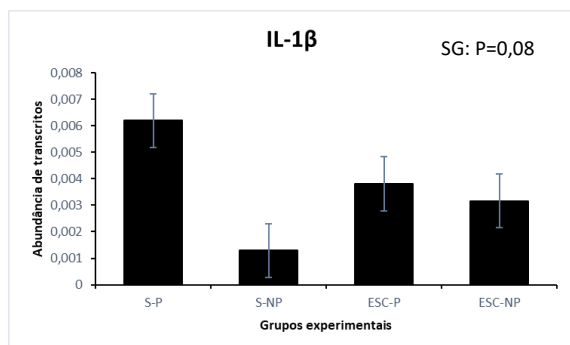


Figura 1: Média da abundância de transcritos dos grupos experimentais para citocina IL-1 $\beta$ . SG: status gestacional.

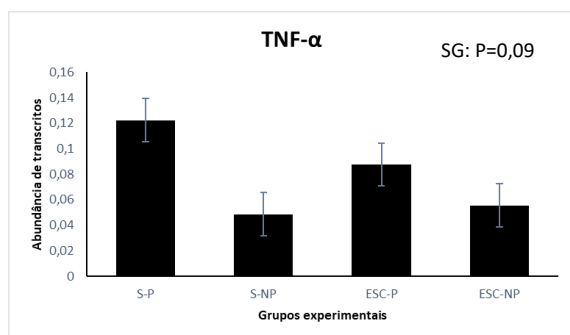


Figura 2: Média da abundância de transcritos dos grupos experimentais para citocina TNF- $\alpha$ . SG: status gestacional.

## Conclusões

Vacas de leite prenhes apresentam maior abundância de transcritos para os genes IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no dia 21 da gestação, independentemente da presença ou não da ESC, evidenciando que a doença não influencia na transcrição destas citocinas pró-inflamatórias neste período da gestação.

## Referências Bibliográficas

Jientaweeboon, S.; Shirasuna, K.; Nitta, A.; Kobayashi, A.; Schuberth, H.; Shimizu, T.; Miyamoto, A. Evidence that polymorphonuclear neutrophils infiltrate into the developing corpus luteum and promote angiogenesis with interleukin-8 in the cow. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 9, p. 10, 2011.

McDougall, S., Macaulay, R., and Compton, C. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2007; 99: 9–23

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, p. 2002, 2001.

# **INFLUENCE OF SUBCLINICAL ENDOMETRITIS ON THE ABUNDANCE OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE TRANSCRIPTS IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ AND IFN- $\gamma$ IN DAIRY COWS**

**Gabriela de Andrade Bruni**

**Diego Angelo Schmidt Poit**

**Guilherme Pugliesi**

Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil

[gabriela.bruni@usp.br](mailto:gabriela.bruni@usp.br)

## **Objectives**

The aim of this study is to evaluate the abundance of transcripts for the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-1 $\beta$  in immune cells from pregnant cows with and without subclinical endometritis, analyzing whether this disease can alter their expression.

## **Materials and Methods**

The experiment was carried out on a commercial farm located in Arceburgo/MG, located 125 km from Pirassununga/SP. Fifty Holstein cows, which were between 40 and 55 days postpartum, were used.

On D-10 (D0, the day of insemination) the animals were evaluated using the Metrichick® device, which consists of a metal rod with a rubber tip for the evaluation of cervicovaginal mucus. Only animals with a Metrichick® score less than 3 were used and submitted to the cytobrush technique, which consists of using an apparatus with a cervical brush coupled to a universal semen applicator, to obtain cells in the uterine lumen and for subsequent counting the proportion of polymorphonuclear cells in relation to the total number of cells (immune and epithelial). Animals with cell numbers greater than or equal to 4% were considered to have ESC. Animals that entered the project were submitted to a hormonal protocol for

ovulation synchronization. For this, the animals received 2 mg of estradiol benzoate at D -10, 0.1 mg of gonadorelin and insertion of an intravaginal progesterone device. Seven days later (D-3) the animals received an application of 0.526 mg of sodium cloprostenol. On D-2, they received 0.5 mg of estradiol cypionate and the intravaginal device was removed. Finally, on D0, they received a second application of gonadorelin and fixed-time artificial insemination was performed.

On D21, the animals were evaluated by transrectal ultrasound in color Doppler mode to assess blood perfusion in the corpus luteum. In addition, blood samples were collected through the tail vein, using 4 heparinized tubes (Vacutainer®), for isolation of immune cells (monocytes and lymphocytes) for later determination of pro-inflammatory cytokine gene expression through qPCR.

On D32, a confirmatory pregnancy diagnosis was made by ultrasound to identify the embryo with a heartbeat. Thus, cows were classified into 4 groups, pregnant with ESC (ESC-P), healthy pregnant (S-P), not pregnant with ESC (ESC-NP) and healthy non-pregnant (S-NP).

## **Results**

The IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  genes, regardless of the presence or absence of ESC, tended to have a higher expression for pregnant animals than

non-pregnant animals (Figures 1 and 2). Gestational status and ESC did not influence IFN- $\gamma$  gene expression ( $P>0.05$ ).

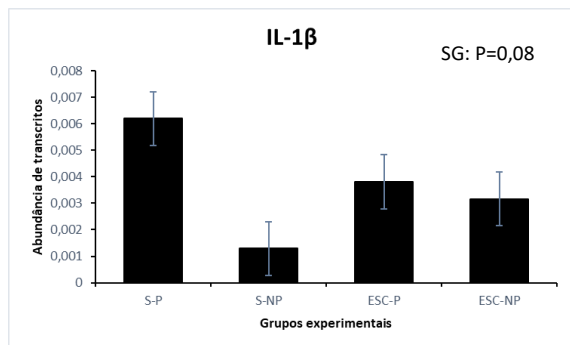


Figure 1: Average abundance of transcripts of the experimental groups for cytokine IL-1 $\beta$ . SG: gestational status.

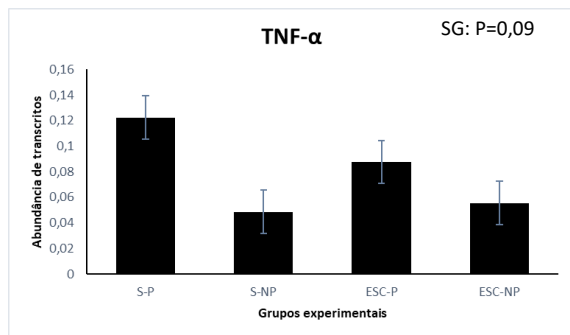


Figure 2: Average abundance of transcripts of the experimental groups for cytokine TNF- $\alpha$ . SG: gestational status.

## Conclusions

Pregnant dairy cows have a greater abundance of transcripts for the IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  genes on day 21 of pregnancy, regardless of the presence or absence of ESC, showing that the disease does not influence the transcription of these pro-inflammatory cytokines during this period of pregnancy.

## References

Jiemitaweeboon, S.; Shirasuna, K.; Nitta, A.; Kobayashi, A.; Schuberth, H.; Shimizu, T.; Miyamoto, A. Evidence that polymorphonuclear neutrophils infiltrate into the developing corpus luteum and promote angiogenesis with interleukin-8 in the cow. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 9, p. 10, 2011.

McDougall, S., Macaulay, R., and Compton, C. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2007; 99: 9–23

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, p. 2002, 2001.