

IMPACTO DA EXPRESSÃO DE PD-1 NA SUSCEPTIBILIDADE E OCORRÊNCIA DE MASTITE BOVINA DURANTE O PERÍODO PÓS PARTO - DADOS PRELIMINARES

HIGOR HENRIQUE COGO^{1*}, LUANA CAROLINA BACHMANN GREGOLIN²,
JÚLIA LUIZA SILVA INÁCIO¹, MARIA EDUARDA ARTUSO SCHNORR¹, MAIARA
GARCIA BLAGITZ³

1 INTRODUÇÃO

As novilhas em rebanhos leiteiros são importantes fontes de reposição das matrizes no rebanho (SANTOS; LOPES, 2014). Doenças que ocorrem com alta frequência afetam negativamente a produção e o desempenho produtivo das novilhas e devem ser uma preocupação relevante dentro da bovinocultura leiteira (COMPTON et al., 2007, PARKER et al., 2007, FOX, 2009).

A mastite é uma das doenças mais comuns e prejudiciais que as fêmeas bovinas podem experimentar (BLAGITZ et al., 2013). Essa enfermidade interfere na renda dos agricultores, afeta diretamente o bem-estar do animal acometido, diminui a qualidade do leite e ainda se torna interesse da saúde pública, devido ao aumento do risco de resíduos no leite pelo uso inadequado de antimicrobianos e o surgimento de bactérias resistente (DE VLIEGHER et al., 2012).

O uso de antimicrobianos é uma grande preocupação mundial. O emprego de antimicrobianos em rebanhos leiteiros está frequentemente relacionado com a saúde do úbere, utilizados para o tratamento e controle de mastite (SVILAND; WAAGE, 2002; RUEGG, 2017). Apesar de serem considerados essenciais para o tratamento de infecções bacterianas, há um grande questionamento quanto a utilização de produtos antimicrobianos e o desenvolvimento de resistências tanto de microrganismos de animais quanto de humanos. Desta forma, torna-se urgente a introdução de alternativas para o tratamento e controle de mastite sem a utilização de antimicrobianos (FRANCOZ et al., 2017; DE VIEGHER et al., 2012). De acordo com esta necessidade mundial, acredita-se que uma das alternativas para tratar e controlar a mastite é por meio do conhecimento e entendimento dos mecanismos do sistema imunológico desses animais (REIS et al., 2016).

¹ Acadêmicos de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Realeza, contato: cogohigor@gmail.com, julialuizainacio19@gmail.com, maria-eduardaaschnorr@hotmail.com

² Mestranda do Programa de Pós Graduação em Saúde, Diagnóstico e Bem-Estar Animal da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Realeza, contato: lubgregolin@gmail.com.

³ Docente adjunta, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Realeza, Orientadora.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Investigar o papel da expressão de morte programada 1 (PD-1) e do ligante de morte programada 1 (PD-L1) na susceptibilidade e ocorrência de mastite clínica e subclínica durante o período de pós-parto.

2.2 Específicos:

Avaliar a ocorrência de mastite clínica durante o período de pós-parto em novilhas;

Avaliar a ocorrência de mastite subclínica durante o período de parto em novilhas;

Correlacionar esses resultados com parâmetros imunológicos.

3 METODOLOGIA

A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus Realeza* e aprovada pelo protocolo número CEUA nº 5403300919 (ID 000172).

Foram utilizadas trinta novilhas de raça holandesa todas no período do pré- parto e pertencentes à duas propriedades comerciais leiteiras. As amostras de sangue e de leite foram coletadas em cinco momentos. No M0 que corresponde a vinte e um dias antes do parto foram coletadas apenas amostras de sangue. Após a parição, foram coletadas amostras de sangue e de leite nos seguintes momentos: no dia do parto (M1), sete (M2), quinze (M3) e trinta dias após o parto (M4).

As amostras foram colhidas preferencialmente na veia coccígea em quatro frascos do tipo vacutainer® de capacidade de 4 mL com diferentes anticoagulantes. Nos frascos com EDTA foram colhidas amostras de sangue em todos os momentos para hemograma. Nos frascos com anticoagulante heparina foram colhidas amostras de sangue para imunofenotipagem. Nos tubos com anticoagulante fluoreto foram colhidas amostras de sangue para dosagem de glicose. Nos frascos sem anticoagulante foram colhidas amostras de sangue para obtenção de soro que serão destinados para análise bioquímica.

As amostras destinadas ao total de leucócitos e eritrócitos foi realizada pela contagem automática (ABC Vet® ABX™), e como diferencial se utilizará a técnica de esfregaço sanguíneo, corado pelo método Panótico (Laborclin®, Brasil) onde posteriormente será avaliado na microscopia óptica com aumento de 400 x. As amostras destinadas as análises bioquímicas, foram centrifugadas para obtenção de soro, e armazenadas em duplicata em refrigeração de -80 °C, para futuras análises. O beta-hidroxibutirato foi avaliado com o

medidor digital portátil de nome comercial FreeStyle Optium Neo[®]. Além destes, para avaliação do hematócrito realizou-se de um refratômetro dosando assim as proteínas totais plasmáticas, e o fibrinogênio.

Para a coleta de leite, os tetos foram higienizados e avaliados conforme os critérios de Birgel (2004), observando cor, consistência, e presença de massas ou grumos na secreção. As amostras de leite foram coletadas em frascos de tampa rosca com capacidade de 4 mL. Na sequência, as amostras de leite foram coletadas em frascos do tipo Falcon[®] com capacidade de 15 mL destinadas ao *California Mastitis Test* (CMT), a contagem de células somáticas microscópica (CCSM) pelo método de Prescott & Breed (1910) e a contagem de células somáticas DeLaval (CCSD) com o Contador eletrônico DeLaval[®].

As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária - SUHVU da Universidade Federal da Fronteira Sul em uma caixa isotérmica com temperatura controlada de 4 ° C.

Para avaliação do leite com a técnica do CMT, utilizou-se os protocolos e parâmetros segundo Schalm e Noorlander (1957), observando as características quando houve reação. A CCSM está sendo desenvolvida conforme o método Prescott & Breed (1910), como descrito por Della Libera et al (2004), realizando a preparação das amostras, as quais posteriormente serão analisadas em microscopia de campo claro, com magnitude de 100 x. Já a CCSD estava em análise com o Contador de Células Somáticas DeLaval[®], porém, devido a pandemia da Covid-19, a DeLaval[®] e a alta do dólar, a análise tornou-se inviável com os recursos disponíveis para realização do projeto.

Por conta do exposto, tornou-se necessário a avaliação da CCSD pelo método denominado Contagem de Células Somáticas Microscópica Diferencial (CCSMD) conforme a descrição de Della Libera et al. (2004). As amostras de todos os animais foram processadas e posteriormente serão analisadas em microscópio óptico, com aumento de 1000x..

Durante todo o estudo, todos os animais foram acompanhados diariamente e caso ocorresse a presença de mastite clínica e subclínica era realizado o registro. No momento da ordenha foi realizado o teste da caneca de fundo preto e semanalmente foi realizado o CMT. Os animais foram avaliados pelo exame físico da glândula mamária e pelo exame físico geral, registrando os valores obtidos para futura discussão.

As análises bioquímicas, isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), exame bacteriológico, contagem de células somáticas, são técnicas já foram processadas em parte e demandam de procedimentos que devem ser realizados nos próximos meses. Para as análises de imunofenotipagem, as amostras de isolados celulares serão

enviados ao Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde será realizada a citometria de fluxo e quantificação das células mononucleares, PD-1 e PD-L1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como citado anteriormente, alguns dados foram computados, e outros estão em processamento. Logo, encontra-se a baixo, a média dos dados relacionados a utilização das amostras de sangue das técnicas já realizadas.

Momento	Eritrócitos (10 ⁶ /uL)	Hematócrito (%)	Fibrinogênio (mg/dL)	Proteínas totais plasmáticas (g/dL)	Leucócitos (células/mL)	Beta-hidroxi-butarato (mg/dL)
M0	5,92(±1,13)	28,96(±2,69)	540 (±240,43)	6,94 (±0,60)	18.940(±10,69)	0,4620 (±0,20)
M1	6,37(±0,93)	30 (±3,28)	493,10(±241,43)	6,74 (±0,84)	24.575(±11,90)	0,6033 (±0,40)
M2	6,64(±4,31)	27,83(±2,22)	662,07(±388,59)	7,08 (±0,63)	20.286(±9,79)	0,8827 (±0,90)
M3	5,68(±0,96)	27,22(±2,69)	511,11(±192,81)	7,58 (±0,62)	17.444 (±7,58)	0,825 (±0,76)
M4	6,19(±0,96)	27,59(±2,88)	527,07(±307,60)	7,91 (±0,63)	17.973 (±9,02)	0,6689 (±0,42)

Tabela 01: Média e desvio padrão das variáveis analisadas no estudo.

M0: Momento 0- vinte e um dias antes do parto; **M1:** Momento 1- no dia do parto; **M2:** Momento 2- sete dias após o parto; **M3:** Momento 3- quinze dias após o parto; **M4:** Momento 4- trinta dias após o parto.

Como acompanhado diariamente, não notou-se nenhum caso de mastite clínica nos trinta animais em todos os momentos, utilizando o teste da caneca de fundo preto, porém, ocorreram casos de mastite subclínica diagnosticado a partir do CMT. No M 1, 25 animais apresentaram mastite subclínica a técnica de CMT variando entre 1 a 3 cruces em ao menos um dos quartos, e cinco animais foram negativos. No M2, 22 animais foram positivos ao teste, e oito animais negativos. No M3, 19 animais foram positivos ao teste, e 11 animais se demonstraram negativo. No M4, 13 animais foram positivos, enquanto 17 animais foram negativos.

O exame físico tanto da glândula mamária, quanto o exame físico geral de cada animal, foi realizado computando os dados durante todas as coletas, porém não se notou nenhuma variação brusca, independente do momento, que denotasse indício de alguma enfermidade. O índice de escore corporal, variou entre 2 a 4, sendo maior no pré- parto, diminuindo no M1, e se mantendo até o M5.

Realizou-se até o momento a coleta e preparação de material de todos os momentos dos trinta animais, porém, alguns materiais ainda estão em processamento para posteriormente realizar a apresentação e discussão dos resultados finais.

5 CONCLUSÃO

O estudo ainda está em andamento. Alguns dados não foram processados e analisados. Espera-se que com o presente estudo, se encontre a relação do PD-1 na susceptibilidade e ocorrência de mastite no pós-parto, para que a partir deste conhecimento, uma nova e eficaz terapia para controlar a infecção intramamária, reduzindo o uso de antimicrobianos intramamários possa ser identificada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRGEL, E. H. Semiologia da glândula mamária de ruminantes. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Editora Roca, 2004. 807 p.
- BLAGITZ, M.G. et al. Function of milk polymorphonuclear neutrophil leukocytes in bovine mammary glands infected with *Corynebacterium bovis*. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3750-3757, 2013.
- COMPTON, C. W. R.; HEUER, C.; PARKER, K.; McDOUGALL, S. Epidemiology of Mastitis in Pasture-Grazed Peripartum Dairy Heifers and Its Effects on Productivity. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n.9, p. 4157-4170, 2007.
- DELLA LIBERA, A. M. M. P. et al. Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1087-1092, 2004.
- DE VliegHER, S. et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1025-1040, 2012.
- FOX, L. K. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 82-88, 2009.
- FRANCOZ, D. et al. Invited review: A systematic review and qualitative analysis of treatments other than conventional antimicrobials for clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 7751-7770, 2017.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W. & Bruss, M. L. (Eds.) (1997). Clinical biochemistry of domestic animals. 5 th ed., New York, USA: **Academic Press**.
- REIS, J.F. et al. Perfil sérico proteico de vacas Holandesas no período de transição. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 3, 2016.
- RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381-10397, 2017.
- SANTOS, G.; LOPES, M. A. Custos de produção de fêmeas bovinas leiteiras do nascimento ao primeiro parto. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 11-19, 2014.
- SCHALM, O. M.; NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, p. 199-204, 1957.
- SVILAND, S.; WAAGE, S. Clinical bovine mastitis in Norway. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 54, n. 1, p. 65-78, 2002.
- VERGARA, C. F. et al. Risk factors for postpartum problems in dairy cows: Explanatory and predictive modeling. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n.7, p.4127-4140, 2014.

Palavras-chave: Sistema Imune. Saúde. Glândula mamária. Antimicrobianos.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES- 2020-0355.

Financiamento UFFS/2020.