

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, DAVI DAYAN ASSENHEIMER², MARIA EDUARDA ARTUSO SCHNORR¹, MAIARA GARCIA BLAGITZ³

1 Introdução

As novilhas leiteiras 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 (COMPTOM 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 resistentes (DE VLIEGHER et al., 2012).

O emprego de antimicrobianos em rebanhos leiteiros está frequentemente relacionado com a saúde do úbere e é uma preocupação cosmopolita, tendo em vista sua ampla utilização (SVILAND; WAAGE, 2002; RUEGG, 2017). Apesar de serem considerados essenciais para o combate de infecções bacterianas, existe um grande debate quanto sua utilização, devido ao desenvolvimento de resistências e seus consequentes riscos à saúde pública.

Em vista disso, evidencia-se a necessidade do desenvolvimento e introdução de alternativas para o tratamento e controle de mastite sem a utilização de antimicrobianos (FRANCOZ et al., 2017; DE VIEGHER et al., 2012) e acredita-se que para isso, é necessário amplo 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, maria-eduardaaschnorr@hotmail.com

² Mestre/mestrando do Programa de Pós Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Realeza, contato: lubgregolin@gmail.com, assendavi@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) 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 CEUA nº 5403300919 (ID 000172).

Para o estudo, foram utilizadas trinta novilhas da raça holandesa em período periparturiente, pertencentes a duas propriedades comerciais leiteiras do sudoeste do Paraná. Foram coletadas amostras de sangue aos vinte e um dias antes do parto (M0), e amostras de leite e sangue em outros quatro momentos distintos: no dia do parto (M1), sete (M2), quinze (M3) e trinta dias após o parto (M4).

As amostras foram colhidas via veia coccígea em frascos do modelo Vacutainer® com capacidade de 4 mL. O primeiro com anticoagulante EDTA (hemograma), o segundo com heparina (imunofenotipagem), o terceiro com fluoreto (dosagem de glicose) e o último sem anticoagulante (obtenção de soro e análise bioquímica).

Os totais de leucócitos e eritrócitos foram obtidos através da contagem automática (ABC Vet®- ABX™). Para realização da contagem diferencial utilizou-se a técnica de esfregaço sanguíneo, corado pelo método Panótico rápido (Laborclin®, Brasil) e posteriormente foi analisado por meio de microscopia óptica com aumento de 400x. As amostras destinadas as análises bioquímicas foram centrifugadas para obtenção de soro, armazenadas em duplicata em refrigeração de -80 °C e posteriormente analisadas. O beta-hidroxi-butarato foi mensurado com o auxílio do medidor digital portátil FreeStyle Optium Neo®. Além destes, para medição do hematócrito utilizou-se um refratômetro para mensuração de proteínas totais plasmáticas e fibrinogênio.

Para a coleta de leite, os tetos foram higienizados e avaliados conforme os critérios de Birgel (2004). As amostras de leite foram coletadas em frascos estéreis de tampa rosca com

capacidade de 4 mL e em frascos do tipo Falcon® com capacidade de 15 mL. 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 via CMT, seguiu-se os protocolos e parâmetros descritos por Schalm e Noorlander (1957). A CCSM foi desenvolvida conforme o método Prescott & Breed (1910), como descrito por Della Libera et al (2004). A técnica de CCSM seria avaliada pelo Contador de Células Somáticas DeLaval®, mas em função da pandemia tornou-se inviável. A técnica foi alterada para a contagem microscópica (Contagem de Células Somáticas Microscópica Diferencial – CCSMD) conforme as recomendações de Della Libera et al. (2004).

Durante todo o estudo, todos os animais foram acompanhados diariamente e no caso de ocorrência de mastite clínica e subclínica foi registrado. Em todas as ordenhas foi realizado o teste da caneca de fundo preto e semanalmente foi realizado o CMT.

Para as análises de imunofenotipagem, as amostras de isolados celulares foram enviadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Neste local foi realizada a citometria de fluxo e quantificação das células mononucleares e PD-1.

4 Resultados e Discussão

O estudo ainda necessita da realização de cálculos estatísticos dos dados relacionados a análise hematológica, dados de campo e imunológicos em comparação a diferentes informações e estudos para melhor discussão e publicação oficial dos resultados. Porém, foi possível apresentar e discutir alguns dados demonstrando a relevância do estudo.

No acompanhamento diário, não se notou 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 M1, 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.

Em relação aos resultados imunológicos, é de grande relevância a relação entre a PD-1

e a ocorrência de mastite. Sendo que, o aumento de casos influenciados pela PD-1 foi de 1,098 (Tabela 1). Possibilitando observar significância estatística, sendo que quanto maior a expressão da PD-1 no período que antecede o parto, maior a ocorrência de mastite no pós parto.

Tabela 1 – Análise de estimativa através de *Odds Ratio* da influência da PD-1 na ocorrência de mastite subclínica.

Estimativa de Probabilidade

Efeito	Ponto estimativo	Limites de confiança (95%)	
Fazenda	0.113	0.004	2.894
Linfócitos (GM)	1.098	0.992	1.214
Linfócitos PD-1 (FP)	0.959	0.695	1.324
Linfócitos PD -1 (GM)	0.940	0.882	1.001

Legenda: GM (geomean). FP (frequent of parent).

De Souza (2022) relacionou a incidência de metrite e endometrite no pós-parto, em que foi possível notar que quanto maior a expressão de PD-1 e CTLA-4 no pré e pós-parto, era característico de animais positivos as enfermidades. Em contrapartida, Goto *et al* (2017) obtiveram resultados que sugerem que a via da PD-1/PD-L1 estão envolvidas na exaustão imunológica de linfócitos específicos de micoplasma bovino, apesar de ser necessário mais estudos por se tratar de uma via de regulação positiva.

Desta forma, a partir da observação de diferentes estudos que trabalham com a via de regulação de linfócitos, o presente estudo torna-se um marco importante a futuras terapias que podem ser desenvolvidas como alternativa de tratamento usando a regulação positiva do sistema imune.

5 Conclusão

O presente estudo ainda necessita de resultados estatísticos para que haja discussões mais aprofundadas para posterior conclusão final. Outrossim, até o momento foi possível identificar a influência da PD-1 na ocorrência de mastite, tendo em vista que quanto maiores os valores desta proteína, maior a ocorrência da enfermidade. A partir desses dados, será possível realizar mais estudos visando investigar mais a fundo sobre a via de regulação dos receptores inibitórios, assim como identificar, possibilitando futuramente utilizá-los como

forma de controle da mastite em rebanhos leiteiros.

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.
- GOTO, S. *et al.* Increase of cells expressing PD-1 and PD-L1 and enhancement of IFN- γ production via PD-1/PD-L1 blockade in bovine mycoplasmosis. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 5, n. 3, p. 355-363, 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.
- SOUZA, C. M. S. **Expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos t e sua relação com o período periparturiente e a citologia endometrial no período pós-parto em vacas leiteiras**. 2022. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Curso de Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba – UFPB – Areia, Paraíba.
- 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: Antimicrobianos. Glândula mamária. Saúde. Sistema Imune.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2020-0355/ PES-2021-0109

Financiamento: CNPq