



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS REALEZA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE, BEM ESTAR E PRODUÇÃO
ANIMAL SUSTENTÁVEL NA FRONTEIRA SUL**

LUANA CAROLINA BACHMANN GREGOLIN

**IMPACTO DA EXPRESSÃO DE PD-1 E CTLA-4 EM LINFÓCITOS NA
SUSCEPTIBILIDADE E OCORRÊNCIA DE MASTITE DURANTE O PERÍODO
PÓS PARTO EM VACAS PRIMÍPARAS**

REALEZA

2022

LUANA CAROLINA BACHMANN GREGOLIN

**IMPACTO DA EXPRESSÃO DE PD-1 E CTLA-4 NA EM LINFÓCITOS NA
SUSCEPTIBILIDADE E OCORRÊNCIA DE MASTITE DURANTE O PERÍODO
PÓS PARTO EM VACAS PRIMÍPARAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul, da Universidade Federal Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Realeza, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maiara Garcia Blagitz Azevedo

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marta Lizandra do Rêgo Leal.

REALEZA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Gregolin, Luana Carolina Bachmann

Impacto da expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos na susceptibilidade e ocorrência de mastite durante o período pós parto em vacas primíparas / Luana Carolina Bachmann Gregolin. -- 2022.

92 f.

Orientadora: Doutora Maiara Garcia Blagitz Azevedo

Co-orientadora: Doutora Marta Lizandra do Rêgo Leal
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, N, N, 2022.

1. Bovinos leiteiros. 2. Pontos de controle imunológico. 3. Sistema imune na glândula mamária. 4. Periparto. 5. Metabolismo. I. Azevedo, Maiara Garcia Blagitz, orient. II. , Marta Lizandra do Rêgo Leal, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LUANA CAROLINA BACHMANN GREGOLIN

**IMPACTO DA EXPRESSÃO DE PD-1 E CTLA-4 EM LINFÓCITOS NA
SUSCEPTIBILIDADE E OCORRÊNCIA DE MASTITE DURANTE O
PERÍODO PÓS-PARTO EM VACAS PRIMÍPARAS**


Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde, Diagnóstico e Bem-estar Animal na Fronteira Sul.

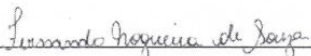
Esta dissertação de mestrado foi defendida e aprovada pela banca em:

13/05/2022

BANCA EXAMINADORA


Prof.ª. Dr.ª. Maiara Garcia Blagitz Azevedo – UFFS
Orientadora


Prof.ª. Dr.ª. Silvana Giacomini Collet


Prof. Dr. Fernando Nogueira de Souza

AGRADECIMENTOS

Quando olho para o início de tudo percebo que tenho muito para agradecer. Começo agradecendo primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida! Acredito imensamente neles, acredito nessa força maior, nos propósitos preparados pra minha vida e acredito que com eles estou sempre protegida. Assim sigo guiada pelos bons caminhos e agradecida por tudo de bom que aconteceu na minha vida.

E aqui me deparo com o seguinte dilema: a quem devo agradecer primeiro? É complexo, pois o que percebo é que não chegaria aqui sozinha, essa caminhada não foi somente minha, e sim de muitas pessoas e animais. Meus pais, irmã, sobrinho, orientadora, minhas vacas, primos, primas, amigos, amigas, todos que fizeram parte tem um pedacinho do meu coração.

Começo agradecendo aos meus pais. Valmir e Zenira. É difícil falar, pois mesmo que conseguisse colocar tudo o que estou sentindo nesse momento, não seria suficiente para agradecer tudo o que eles fizeram por mim. Eles representam tudo para mim, meu porto seguro, para onde eu quero correr quando estou feliz e quando estou triste também. Meu amparo, a palavra amiga e que conforta sempre que preciso. Por um amor sem medidas e incondicional eu fui agraciada antes mesmo de nascer. E estar aqui, defendendo esse mestrado, não é somente mérito meu. Esse sonho foi sonhado por meus pais também. Aquele casal, com poucos recursos, agricultores familiares, que tiveram uma vida difícil, mas que nunca abriram mão de educar e incentivar suas filhas a buscarem uma graduação, a serem independentes e sonharem seus sonhos. É por isso que estou aqui. É por isso que continuo lutando. Me sinto grata, principalmente quando vejo o brilho nos olhos deles quando falam que tem uma filha veterinária e que ainda faz mestrado. Eu sei o quanto eles se orgulham das minhas conquistas, mas elas são mais deles do que minhas.

Agradeço a minha irmã, sobrinho e primo (irmão). Leticia, Miguel e Sandro. Eles também são minha fortaleza. O esforço deles também me fez chegar até aqui e vai fazer eu ir mais longe. Minha irmã é um exemplo de força. Me inspiro muito na mulher que ela é, batalhadora, mãe, agrônoma, dedicada. Ela é mais que um exemplo, foi meu amparo muitas vezes. Eu sei o quanto ela me defende, com unhas e dentes. Vai ser sempre uma pela outra, uma com a outra e sempre juntas!

E meu sobrinho Miguel, aqui meu coração da pulinhos e meus olhos insistem em lacrimejar. Eu não precisaria falar nada, pois eu sei que ele sente todo o amor que tenho

por ele. Um amor tão puro. Nossa família é muito melhor depois que você chegou. Somos todos agraciados por uma criança alegre, brincalhona, com um coração gigante, que tem um amor sem medidas pelos animais, principalmente pelas vacas. Agradeço, pois mesmo sem perceber, ele me fez lutar muito para estar aqui, me manteve motivada e forte, me alegrou nos momentos tristes e me fez chorar com seus gestos de amor. Você é luz Miguel, você é nossa luz! Vou estar sempre aqui para o que precisar.

Agradeço também ao meu primo Sandro, que é meu irmão mais velho, por todo o apoio, carinho e amor incondicional. E pra finalizar, volto a agradecer as pessoas que mais estiveram comigo durante esse período, meus pais, irmã, primo e sobrinho, entre tantas coisas, umas delas foi ficar em chamada de vídeo comigo por horas e horas nas noites sozinha no laboratório. Acredito que não era a melhor coisa pra se fazer durante as noites, mas vocês estavam ali, me acompanhando, me distraíndo quando estava com medo, e não me deixando cair nunca. Eu sou a pessoa mais abençoada do mundo por ter vocês comigo.

A minha orientadora, professora Maiara Garcia Blagitz Azevedo. Minha grande inspiração na pesquisa. Se estou finalizando hoje, foi porque caminhamos juntas. Caímos muitas vezes, principalmente quando o assunto era verba para a pesquisa. Graças a ela e a seu currículo, essa proposta foi aceita em três editais de fomento da UFFS, que permitiram a compra de muitos materiais e reagentes e assim conseguimos resultados importantes. Passamos por muitos desafios, mas chegamos na reta final e não vamos parar aqui. Obrigada por tudo professora, principalmente por me manter motivada e por me ensinar a nunca desistir. Você é um exemplo a ser seguido. Sei que posso sempre contar com você e você sempre poderá contar comigo. Aqui começamos como orientadora e orientada, mas terminamos essa fase como grandes amigas.

A minha co-orientadora, professora Marta Lizandra do Rêgo Leal, que apesar da distância se fez presente desde o início dessa pesquisa. Sou grata por todo o apoio de sempre.

Aos produtores, Joari e Osni e suas famílias, que gentilmente cederam seus animais para essa pesquisa. Obrigada por todo o acolhimento, por terem nos recebidos durante muitas e muitas visitas, sempre com um sorriso no rosto. Com toda a certeza sem vocês e suas vacas essa pesquisa não teria acontecido. Vocês fizeram a diferença. Obrigada por me receberem, mesmo com a pandemia, com todo o cenário de incertezas e o medo. Obrigada ao pequeno Murilo, que era meu “aluninho” durante as coletas da

pesquisa, você me motivou a continuar. Nunca vou esquecer do seu rostinho cheio de sardas me pedindo se poderia ajudar.

Obrigada aos meus bolsistas, que me auxiliaram sempre que possível. Higor, Roseli e Júlia. Obrigada aos demais voluntários, que mesmo sem bolsa se mantiveram firmes durante a coleta, Everton, Maria Eduarda, Regiane, Eloise, Julia, Stefanie, Thahis e Guilherme. Vocês fazem parte de toda essa pesquisa, de todos os méritos e de todos os bons frutos que pretendemos colher. Obrigada pela parceria nos momentos de coleta, obrigada por não desistirem nas madrugadas frias e chuvosas do nosso inverno. Obrigada por me acompanharem até altas horas e em datas comemorativas. Com certeza vocês vão ser sempre lembrados com muito carinho por mim.

Aos professores Luciana Bignardi de Soares Brisola Casimiro da Costa e Bruno Moura Monteiro, por todo auxílio e execução da análise estatística. Obrigada por estarem comigo e sanarem minhas dúvidas “bobas” que a estatística proporciona.

Ao professor Fernando Nogueira de Souza, por toda ajuda com os anticorpos e citometria e também a professora Kamilla Reis, que esteve presente em todos os momentos de execução desses exames.

A toda equipe da professora Alice Melville Paiva Della Libera, por me acolherem em SP e me ajudarem com vários resultados. Agradeço de forma especial ao José, Mariluce e Robson, que gentilmente me receberam em seu apartamento durante a estadia na cidade grande.

A todo o corpo docente do PPG-SBPAS que fizeram parte da minha formação e foram grandes incentivadores nessa caminhada. A UFFS que me acompanha desde a graduação. Aqui é minha casa também. Obrigada a todos os professores, técnicos, seguranças e auxiliares que estiveram comigo durante esse processo.

Agradeço de forma especial a professora Luciana Pereira Machado e Fernanda Saggin por toda ajuda no laboratório de análises clínicas. Ao professor Gentil, que auxiliou na organização e remanejamento dos equipamentos necessários para a execução do experimento. A professora Adalgiza, que nos cedeu um equipamento do seu laboratório para realização da pesquisa. Ao pessoal do laboratório COVID, que permitiu que parte da pesquisa fosse desenvolvida dentro desse laboratório, mesmo com todos os riscos, conseguimos finalizar todos os processos. Agradeço de forma especial ao professor Felipe, responsável pelo laboratório COVID, que entendeu nossa situação e nos auxiliou no cumprimento do cronograma.

Aos meus amigos que acompanharam toda a saga de experimento. Não queria citar nomes pra não esquecer ninguém. Agradeço de coração a todos que estiveram comigo e me distraíram nos momentos difíceis. Alguns de vocês é impossível não citar, Kathi, Paloma, Christian, Michele, Ires, Thays, Regiane, Júnior, Rodolfo Neto, Jack, Odair, Meire, Ana, Andressinha, Tainá e Polly e tantos outros que sempre me apoiaram e escutaram nos momentos difíceis.

Agradeço a cada novilha que foi avaliada durante o experimento. Não foram dias fáceis, mas elas sempre estiveram comigo. Eu sei o quanto esse período foi difícil pra elas. Primeiro devido ao fato de nunca terem sido ordenhadas. Eu respeito e acolho o incomodo causado principalmente nos primeiros dias. Sei que não deve ter sido fácil, mas juntas conseguimos. Não posso deixar de agradecer por terem sido a melhor parte do experimento. Quem convive comigo sabe o quanto eu falo de vacas, o quanto eu amo e respeito esse animal maravilhoso. Eu acordava feliz as três da manhã, sabendo que ia encontrar vocês, prontas pra ordenha. Esse amor que tenho pelas vacas foi o que me manteve firme em muitos momentos. Eu espero viver o resto da minha trabalhando com vocês e trabalhando por vocês.

Por último, deixo um desabafo de alguém que pertenceu a classe que não teria chance nenhuma de ter uma casa própria e confortável no interior, de ingressar na faculdade, de ganhar bolsas de IC, de fazer mestrado, ser bolsista, de se manter “só estudando”, se não fossem as políticas públicas voltadas para a educação e pesquisa. Eu sou grata a isso. Minha luta daqui pra frente é para que essas oportunidades não falem a jovens como eu. Minha luta é para que jovens do campo busquem a educação. Minha luta é para que a educação seja libertadora. Eu espero ser melhor a cada dia. Não sei o que esperar do futuro, se seguirei firme como pesquisadora, professora, ou uma simples veterinária amante das vacas, mas com toda a certeza do mundo, quero poder ajudar jovens como eu chegarem onde eu cheguei.

RESUMO

O periparto é um período crítico em todas as espécies, principalmente para a espécie bovina. É nesse período que os animais passam por diversas mudanças anatômicas, fisiológicas e comportamentais. As diversas alterações afetam diretamente o sistema imune desses animais, levando muitas vezes a um estado de imunossupressão. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência dos receptores inibitórios negativos, PD-1 e CTLA-4, na susceptibilidade e ocorrência de mastite no pós-parto em novilhas, além de abrir caminhos para novas formas terapêuticas. Para isso, 30 novilhas foram selecionadas para compor o estudo. Todas sem histórico recente de enfermidades e com prenhez confirmada. As avaliações começaram aos quinze dias antes do parto (M1). Com a chegada do parto, os animais foram avaliados nesse momento (M2), sete (M3), quinze (M4) e trinta dias após o parto (M5). A avaliação imunológica foi realizada apenas no M1, as avaliações de rotina e exames sanguíneos ocorreram em todos os momentos, enquanto que as avaliações da secreção láctea ocorreram a partir do momento do parto. Para avaliação imune foi realizada a separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e os linfócitos foram preservados com intuito de realizar a imunofenotipagem. Durante as coletas, os animais passaram por um exame clínico completo, além dos exames complementares como o hemograma, dosagem de beta-hidroxi-butirato (BHB), ácidos graxos não esterificados (AGNE), glicose, cálcio, fósforo, colesterol, triglicerídeos, gama glutamil transferase (GGT), alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST), ureia, proteínas totais e creatinina. O leite foi avaliado pelo exame da caneca do fundo escuro, *California Mastitis Test* (CMT), contagem de células somáticas microscópica diferencial (CCSMD) e exame bacteriológico, com posterior identificação bacteriana por Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-ToF-MS). Os resultados obtidos foram distribuídos em três artigos, que estão dispostos a seguir.

Palavras-chave: Bovinos. Periparto. Novilhas. Imunologia. Metabolismo. Regulação dos receptores inibitórios.

ABSTRACT

The peripartum is a critical period in all species, especially for the bovine species. It is during this period that the animals go through several anatomical, physiological and behavioral changes. The various changes directly affect the immune system of these animals, often leading to a state of immunosuppression. Thus, the objective of this study was to evaluate the influence of negative inhibitory receptors, PD-1 and CTLA-4, in the susceptibility and occurrence of postpartum mastitis in heifers, as well as to open paths to new therapeutic forms. For this, 30 heifers were selected for the study. All of them had no recent history of diseases and confirmed pregnancy. The evaluations began fifteen days before delivery (M1). With the arrival of the calving, the animals were evaluated at this time (M2), seven (M3), fifteen (M4) and thirty days after calving (M5). The immunological evaluation was performed only at M1, routine evaluations and blood tests occurred at all times, while the evaluation of milk secretion occurred from the time of calving. For immune evaluation, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated, and lymphocytes were preserved in order to perform immunophenotyping. During collection, the animals underwent a complete clinical examination, in addition to complementary tests such as blood count, determination of beta-hydroxybutyrate (BHB), non-esterified fatty acids (NFA), glucose, calcium, phosphorus, cholesterol, triglycerides, gamma glutamyl transferase (GGT), alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), urea, total protein, and creatinine. Milk was evaluated by dark-bottom mug test, California Mastitis Test (CMT), differential microscopic somatic cell count (DMSC), and bacteriological examination, with subsequent bacterial identification by matrix-assisted laser Ionization and desorption (MALDI-ToF-MS). The results obtained were distributed in three articles, which are arranged as follows.

Keywords: Cattle. Peripartum. Heifers. Immunology. Metabolism. Regulation of inhibitory receptors.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1.

Tabela 1 - Resultados da correlação de Pearson obtidos na comparação entre os métodos de avaliação de BHB dos aparelhos KetoVet®, Free Style® e Automático.....	33
--	----

ARTIGO 2.

Tabela 1 - Médias dos escores de avaliação da condição corporal e desvio padrão (σ)..	46
Tabela 2 - Número e frequência de animais com diagnóstico positivo e negativo para a mastite subclínica.....	47
Tabela 3 - Médias e desvio padrão (σ) dos resultados obtidos nos exames bioquímicos em diferentes momentos avaliativos.....	49
Tabela 4 - Número de animais que apresentaram em seus exames resultados abaixo do valor de referência, resultados dentro do esperado, acima e exames não realizados.....	50

ARTIGO 3.

Tabela 1 - Médias e desvio padrão (σ) dos parâmetros vitais avaliados nos diferentes momentos.....	67
Tabela 2 - Médias e desvio padrão (σ) dos resultados obtidos no hemograma nos diferentes momentos avaliativos.....	68
Tabela 3 - Número e a frequência de animais em relação aos escores de higiene observados nos diferentes momentos.....	69
Tabela 4 - Quantidade e frequência de animais que apresentaram diferentes escores do CMT observados nos diferentes momentos.....	70
Tabela 5 - Quantidade e frequência de isolamento de bactérias em amostras de leite nos diferentes momentos.....	71
Tabela 6 - Média e desvio padrão (σ) de CCSMD, demonstrando a contagem de linfócitos, macrófagos e neutrófilos nos diferentes momentos.....	73
Tabela 7 - Análise de estimativa da influência da PD-1 e CTLA – 4 na ocorrência de mastite subclínica.....	75
Tabela 8 - Análise de estimativa através de Odds Ratio da influência da PD-1 e CTLA – 4 na ocorrência de mastite subclínica.....	76

LISTA DE GRÁFICOS

ARTIGO 1.

Gráfico 1. BHB (médias±EPM) e valores de P (Exame, Tempo e Exame*Tempo) obtidos nos cinco momentos de avaliação através do teste automático e aparelhos portáteis Free Style® e KetoVet®.....	32
Gráfico 2. Curva de regressão linear simples entre o aparelho Automatizado e Free Style®. Equação = $0.0969 + (0.842 * \text{Free Style})$. $R^2 = 0.9110$; $P < 0.0001$	34
Gráfico 3. Curva de regressão linear simples entre o aparelho Automatizado e KetoVet®. Equação = $-0.473 + (0.989 * \text{Ketovet})$; $R^2 = 0.7890$; $P < 0.0001$	35
Gráfico 4. Comparação entre medidor portátil Free Style® e Automatizado para medição de BHB em amostras de sangue de 30 novilhas. (A) Gráfico de diferenças de Bland Altman. (B) Gráfico de dispersão de Bland Altman.....	36
Gráfico 5. Comparação entre medidor portátil KetoVet® e Automatizado para medição de BHB em amostras de sangue de 30 novilhas. (A) Gráfico de diferenças de Bland Altman. (B). Gráfico de dispersão de Bland Altman.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AGNE** – Ácidos graxos não esterificados
- ALT** – Alanina amino transferase
- APCs** – Células apresentadoras de antígenos
- AST** – Aspartato amino transferase
- BEN**- Balanço energético negativo
- BHB** – Beta hidroxibutirato
- CCS** - Contagem de células somáticas
- CCSMD** - Contagem de células somáticas microscópica diferencial
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CMT** – *Califórnia Mastitis Test*
- CTLA – 4** – Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
- ECC** – Escore de condição corporal
- FC**- Frequência cardíaca
- FR**- Frequência Respiratória
- FS** – FreeStyle®
- F1** – Fazenda 1
- F2** – Fazenda 2
- GGT** – gama glutamil transferase
- IL** - Interleucinas
- Igs** - Imunoglobulinas
- KV** – KetoVet®
- LB** – Linfócitos B
- LT** – Linfócitos T
- MHC** – Complexo de Histocompatibilidade principal
- MRUM** – Movimentos ruminais
- M1** – Momento 1
- M2** – Momento 2
- M3** – Momento 3
- M4** – Momento 4
- M5** – Momento 5
- NK** – *Natural Killer*
- PD-1** – Proteína de morte programada -1

PAMP'S - Padrões moleculares associados a patógenos

PD – L1

PR - Paraná

PRR - Receptores de reconhecimento de padrões

SNA – *Staphylococcus não aureus*

SUHVU – Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária

TH – T helper

TNF – Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. ARTIGO 1	26
Introdução	27
Materiais e métodos	28
Resultados e discussões	31
Referências	39
3. ARTIGO 2	41
Introdução	42
Resultados e discussão	46
Conclusão	52
Referências	53
4. ARTIGO 3	57
Introdução	58
Materiais e métodos	59
Resultados e discussões	65
Conclusão	77
Referências	78
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
6. REFERÊNCIAS	83
7. ANEXO 1	88

1. INTRODUÇÃO

A mastite é a principal enfermidade que acomete os rebanhos leiteiros bovinos em todo o mundo (LANGONI *et al.* 2011; LOPES *et al.* 2012; RUEGG, 2012; COSTA *et al.* 2013). Essa é uma das doenças mais prejudiciais que um rebanho leiteiro pode enfrentar (BLAGITZ *et al.* 2013). É considerada muito onerosa, pois além dos prejuízos econômicos com tratamentos e perdas produtivas, há prejuízos com o descarte precoce de animais (HUIJPS, LAM e HOGVEEN, 2008; LANGONI *et al.* 2011; VLIEGHER *et al.* 2012; AGHAMOHAMMADI, *et al.* 2018; RABOISSON, *et al.* 2020).

A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária e pode ser causada por lesões traumáticas, irritação química, além de ser associada à processos infecciosos causados principalmente por bactérias, fungos, algas e vírus (ZHAO e LACASSE, 2008).

Quanto à classificação, pode ser classificada pela sua forma de apresentação em subclínica e clínica (RADOSTITIS *et al.* 2002; ZAFALON *et al.* 2005). A última forma é caracterizada por anormalidades visíveis no úbere e no leite, cuja gravidade pode variar durante o estágio da doença (ZAFALON *et al.* 2005).

Já a mastite subclínica, é a forma mais predominante da doença, que não é detectada por alterações visíveis no úbere e leite. Neste caso, ambos apresentam aparência normal (ASHRAF e IMRAN, 2018), mas quando examinado, o leite apresenta um aumento da contagem de células somáticas (CCS), além da presença de um ou mais patógenos causadores dessa enfermidade (AGHAMOHAMMADI *et al.* 2020).

Existem diversas alternativas para realizar o diagnóstico de mastite de forma direta e indireta. As formas diretas identificam os agentes causadores, enquanto as formas indiretas identificam as consequências enfrentadas pelas vacas com mastite, como o aumento da celularidade do leite (VARGAS *et al.* 2014; AGHAMOHAMMADI *et al.* 2020).

Como ferramenta diagnóstica indireta, além da CCS (AGHAMOHAMMADI *et al.* 2020), pode-se utilizar o *California Mastitis Test* (CMT) (SCHALM e NOORLANDER, 1957). Entre os métodos diretos encontram-se a cultura microbiológica tradicional (VIRGUIER *et al.* 2009), a cultura na fazenda (LAGO *et al.* 2011) e formas moleculares para identificação do patógeno após o isolamento, como a espectrometria de massa de tempo de voo de desorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) (FENSENLAU e DEMIREV, 2001; BARREIRO *et al.* 2010).

Atualmente, o controle da mastite é uma das alternativas mais utilizadas mundialmente na tentativa de se evitar tantos os prejuízos econômicos como os produtivos (SVILAND e WAAGE, 2002). Além disso, ao controlar a mastite é possível reduzir o uso de antimicrobianos (LAGO *et al.* 2011, SOUZA *et al.* 2012).

Por se tratar da principal enfermidade que afeta a glândula mamária bovina, a mastite ocorre quando os animais se encontram mais vulneráveis, assim, torna-se essencial conhecer e entender como atua o sistema imune de forma geral e especificamente sua atuação na glândula mamária (REIS *et al.* 2016).

Existem momentos na vida dos animais que podem ser mais ou menos desafiadores para o sistema imunológico. Um exemplo é o periparto, que já é bem conhecido por ser um período delicado para as fêmeas de todas as espécies, principalmente para as fêmeas bovinas. Devido as diversas mudanças que ocorrem no funcionamento do organismo das vacas, é possível que essas alterações possam favorecer ao comprometimento do sistema imune (DEPREESTER *et al.* 2017).

Antes do parto há uma maior exigência de energia para o crescimento fetal e síntese de leite. Além disso, estudos indicam que nesse período ocorre uma intensa mobilização lipídica (REIS *et al.* 2016). Ambos eventos propiciam o comprometimento da função das células imunológicas (DEPREESTER *et al.* 2017), que estarão funcionando em segundo plano.

No momento do parto, principalmente quando falamos em novilhas, acredita-se que o estresse envolvido seja ainda maior, devido a inexperiência por parte desses animais, contribuindo para acentuar ainda mais a ocorrência da imunossupressão de forma intensa (ALERI *et al.* 2019).

No pós parto imediato há uma queda no consumo de matéria seca pelos animais, aliada à uma maior demanda de energia e de nutrientes para a síntese do colostro e do leite (MANN, SIPKA e GRENIER, 2019). Como consequência, é possível visualizar uma diminuição nas taxas de glicose circulante, seguido de um aumento nas taxas de gliconeogênese, com mobilização de ácidos graxos não esterificados (AGNEs). Essa intensa mobilização gera a oxidação dos AGNEs em corpos cetônicos, principalmente na forma de Beta-hidroxibutirato (BHB) e o restante é oxidado como triglicerídeos (DRACKLEY, 1999).

Ainda, há alterações na concentração de minerais como o cálcio, que atua de forma direta na imunidade humoral e celular (HANAGATA *et al.* 2018). Essa cascata de eventos favorece o aparecimento de vários distúrbios que podem afetar a eficiência tanto

do sistema imune, mas também afeta diretamente a vida produtiva e reprodutiva dos animais (WANKHADE *et al.* 2017).

Além da compreensão do sistema imune de modo geral é importante compreender o papel exercido por esse sistema na glândula mamária, pois dessa forma pode-se abranger e desenvolver medidas que visam o controle dos casos de mastite e prevenção de novas infecções (RAINARD e RIOLLET, 2006).

Segundo Sordillo (2018), a capacidade das vacas resistirem ao estabelecimento de novas infecções intramamárias depende diretamente da eficiência do sistema imunológico na glândula mamária. O sistema imune de uma vaca acometida com mastite vai funcionar de forma complexa e tem como objetivo evitar a invasão bacteriana, eliminar a infecções existentes e ainda restaurar a função normal do tecido mamário (CARNEIRO, DOMINGUES e VAZ, 2009, SORDILLO, 2018).

Como forma de entender melhor a complexidade do sistema imune da glândula mamária, podemos dizer que se trata de um sistema complexo de tecidos, células e moléculas que trabalham juntos para defender a glândula de patógenos invasores que causam mastite (SORDILLO, 2018). Além disso, podemos classificar as respostas imunes em inata e adaptativa ou adquirida (CARNEIRO, DOMINGUES e VAZ, 2009).

A imunidade inata é predominante durante os estágios iniciais da infecção (CARNEIRO, 2009) e inclui um conjunto de mecanismos que podem ser acionados em segundos a minutos após o desafio bacteriano (SORDILLO, 2018). Esta é considerada a linha de defesa inicial contra os patógenos causadores de mastite.

A imunidade inata representa uma resposta rápida e padronizada a um grande número de estímulos (BRUCKMAIER e WELLNITZ, 2017). É representada por barreiras físicas (anatômicas), químicas e biológicas, células e moléculas solúveis. Ela é presente em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com antígenos ou agentes agressores (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000; SLADEK e RYSANEK, 2010).

Dentre as barreiras anatômicas, podemos citar a pele que, quando se apresenta intacta, contribui para diminuir o risco de contaminações (CARNEIRO, 2009). Além da pele, o canal do quarto é fundamental, pois esta é a principal via de penetração dos agentes causadores da mastite bovina. Entre as ordenhas, esse canal encontra-se normalmente fechado por um anel muscular que é considerado uma barreira física e química, pois além do anel muscular, há um tampão de queratina derivado das células da parede do canal do quarto que também está presente (CARNEIRO, 2009; NEVES, 2011).

O tampão de queratina tem atividade antimicrobiana, além de atuar como barreira física. Durante a ordenha ocorre a remoção deste tampão, causando a flacidez do esfíncter, fazendo com que o canal do quarto esteja mais susceptível a infecções por um período de duas horas após a ordenha. Depois deste período a musculatura retoma seu tônus e o tampão de queratina é novamente formado (ROSA, 2009).

Quando as barreiras físicas não são suficientes, o patógeno acaba alcançando a cisterna da glândula mamária. Nesse ponto, as barreiras solúveis começam atuar, juntamente com as células da imunidade inata (RAINARD, 2003).

Segundo Carneiro (2009), diferentes fatores solúveis possuem atividade microbicida, mas destacam-se três grupos. No primeiro grupo estão fatores que promovem a lise da membrana celular microbiana, representado pelo sistema complemento. No segundo, destacam-se os peptídeos que ligam elementos essenciais, como ferro, representados pela lactoferrina. Por último está o grupo das enzimas hidrolíticas que estão focadas em estruturas microbianas, como a lisozima (LINDE *et al.* 2008).

De modo geral, as células do sistema imune secretam várias citocinas. Um exemplo é que os macrófagos secretam pelo menos quatro interleucinas (IL), a IL-1, IL6, IL-12 e IL-18 (TIZARD, 2008), assim como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Essas citocinas são consideradas como marcadores das defesas da glândula mamária (ALLUWAIMI e CULLOR, 2002) e participam ativamente da resposta inflamatória, pois são essenciais para facilitar o extravasamento de leucócitos da corrente sanguínea e para o local da invasão bacteriana nos tecidos mamários (BOULANGER *et al.* 2003, SORDILLO, 2018).

Ainda, dentro da imunidade inata, temos defesas celulares que trabalham de forma não específica. Estas são representadas pelos neutrófilos, macrófagos, células epiteliais e células *Natural Killer* (NK) (SORDILLO, 2018).

Segundo Carneiro (2009), as células do sistema imune inato apresentam receptores de reconhecimento de padrões (PRR - *pattern recognition receptors*) que são capazes de reconhecer padrões moleculares compartilhados pelos patógenos, que diferem dos padrões do hospedeiro expressos sobre a superfície dos patógenos (PAMPs – padrões moleculares associados aos patógenos).

Na mama saudável, os macrófagos residentes são responsáveis por sintetizarem e liberarem citocinas pró-inflamatórias que atraem a migração dos polimorfonucleares da circulação periférica para o foco inflamatório (BANNERMAN *et al.* 2004, ALNAKIP *et*

al. 2014). Esses atuam na primeira linha de defesa direcionada aos patógenos intramamários (PAAPE *et al.* 2003; CONEJEROS, 2011).

Os macrófagos se originam a partir dos monócitos, que quando estão circulantes denominam-se monócitos e quando estão no tecido ou parênquimas de órgãos, são conhecidos por macrófagos (CRUVINEL *et al.* 2010). Esse é o tipo celular mais abundante na glândula mamária saudável (CARNEIRO, DOMINGUEZ e VAZ, 2009; CARNEIRO, 2009; AKERS e NICKERSON, 2011; SORDILLO, 2018).

Os monócitos e macrófagos são fagócitos eficientes e são responsáveis por removerem patógenos e restos celulares. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos podem permanecer no tecido por meses (CRUVINEL *et al.* 2010; AKERS e NICKERSON, 2011). Além disso, tem a capacidade de secretar várias substâncias mediadoras da inflamação, como as citocinas e componentes derivados do ácido araquidônico, conferindo aos macrófagos um papel de célula sentinela da glândula mamária (RAINARD e RIOLLET, 2003; CRUVINEL *et al.* 2010; AKERS e NICKERSON, 2011).

Quando há um foco inflamatório, as primeiras células a chegarem no local da inflamação na glândula mamária são os neutrófilos (CRUVINEL *et al.* 2010; SOUZA *et al.* 2012). Eles migram da circulação sanguínea para a glândula mamária, devido a sinalização dos mediadores inflamatórios, como as citocinas liberadas por macrófagos e proteínas do sistema complemento (CARNEIRO, 2009; CRUVINEL *et al.* 2010). Estas células atuam de forma intensa, combatendo a infecção por meio da fagocitose e sinalizam para que as demais células migrem para o local da inflamação (TIZARD, 2008).

Assim, logo que recebem uma sinalização, os neutrófilos agem rapidamente no foco da inflamação, mas por terem uma vida útil muito curta, permanecem pouco tempo ativos nesse local (CRUVINEL *et al.* 2010). No leite de quartos saudáveis, os neutrófilos compreendem 5 a 20% da população de células presentes (SORDILLO, 2018). Após infecção da glândula mamária, esse número aumenta consideravelmente, chegando a uma porcentagem de 95% das células presentes (RAINARD e RIOLLET, 2006).

Outro tipo celular presente na imunidade inata da glândula mamária são as células *Natural Killer* (NK). Estas são consideradas uma subpopulação de linfócitos granulares inespecíficos com atividade citotóxica (CARNEIRO, 2009; SORDILLO, 2018). São importantes na vigilância imunológica, fazem parte da imunidade inata e correspondem cerca de 10 a 20% dos linfócitos circulantes (JOBIM e JOBIM, 2008). Além disso,

exibem atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus*, o que é considerada uma importante forma de prevenção da mastite (JOBIM e JOBIM, 2008; CARNEIRO, 2009; SORDILLO, 2018).

Após a exposição microbiana, a imunidade adaptativa leva mais tempo do que a imunidade inata para se desenvolver. Enquanto a imunidade inata age de forma mais generalizada, a imunidade adaptativa é capaz de induzir respostas imunes aos antígenos dos patógenos (SORDILLO e STREICHER, 2002; SORDILLO, 2018).

De qualquer forma, é importante destacar que na glândula mamária é necessário que a imunidade inata e a adaptativa interajam de forma coordenada, com intuito de fornecer uma proteção efetiva contra possíveis invasores (SORDILLO e STREICHER, 2002; ALNAKIP et al., 2014).

O sistema imune adaptativo é capaz de reconhecer células do próprio organismo ou microrganismos estranhos (JOBIM e JOBIM, 2008; SORDILLO, 2018). A resposta adaptativa é desencadeada juntamente com a imunidade inata quando o microrganismo já é conhecido.

Quando ocorre uma infecção por um novo patógeno e a imunidade inata não consegue combater sozinha, a imunidade adaptativa é acionada, reforçando a resposta contra o invasor. Essa capacidade de reconhecer antígenos estranhos é mediada por proteínas que foram ligadas geneticamente a membranas, chamadas complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (MESQUITA JÚNIOR, et al. 2010; SORDILLO, 2018).

Uma resposta imune específica ocorre se os antígenos são combinados com uma molécula MHC na superfície das células, um processo conhecido como apresentação de antígeno (SORDILLO, 2018). Os antígenos capturados são processados dentro da célula e apresentados em sua superfície e inseridos em moléculas do MHC (CRUVINEL et al. 2010), facilitando a destruição pelos linfócitos e demais células efectoras. É crucial para uma formação completa da imunidade específica, que as células apresentadoras de antígenos (APCs) e as células efectoras trabalhem em harmonia (SORDILLO, 2018).

Como característica principal, a imunidade adaptativa gera linfócitos específicos frente aos antígenos e células de memória capazes de reconhecer determinantes antigênicos específicos de um patógeno (AITKEN, CORL e SORDILLO, 2011).

Sordillo (2018) destaca que é encantadora a capacidade do sistema imunológico adaptativo de uma vaca, pois ele é capaz de reconhecer e responder a bilhões de antígenos. Quando um antígeno é encontrado mais de uma vez, ocorre uma elevada

reatividade imunológica como consequência da memória imunológica (MESQUITA JÚNIOR *et al.* 2010; AITKEN, CORL e SORDILLO, 2011; RAINARD, CUNHA e GILBERT, 2016).

Dessa forma, a resposta contra um patógeno em que o animal já foi exposto é muito mais rápida, ampla, forte, duradoura e muitas vezes é mais eficaz no combate de microrganismos patogênicos comparada com a primeira exposição frente a um patógeno desconhecido (RAINARD, CUNHA e GILBERT, 2016; SORDILO, 2018).

Quando se trata de uma primo-infecção, a resposta imune adaptativa pode levar dias para se desenvolver por causa da expansão clonal dos linfócitos B e T específicos para o patógeno invasor (AITKEN, CORL e SORDILLO, 2011).

No sistema imune adaptativo, as principais células responsáveis pelo funcionamento e principais efetoras são os linfócitos B e T. A função dos linfócitos B (LB) é sintetizar e secretar anticorpos que reconhecem e neutralizam fatores de virulência bacteriana específicos para cada antígeno. Já os linfócitos T (LT) tem funções efetoras que incluem a produção de citocinas que vão facilitar a imunidade mediada por células, regulando a magnitude e a duração da resposta imune (CRUVINEL *et al.* 2010; AITKEN, CORL e SORDILLO, 2011).

Os linfócitos B produzem anticorpos, também chamados de imunoglobulinas (Igs), contra patógenos invasores. Para a formação de memória, usam moléculas de anticorpos ligadas à membrana para reconhecer patógenos específicos. Após esse reconhecimento, os LB podem internalizar, processar e apresentar antígenos para os linfócitos T Helper (TH), também chamados de linfócitos CD4+. Estas células são ativadas e começam a secretar citocinas, incluindo IL-2, que por sua vez induz a proliferação e diferenciação dos LB em células plasmáticas produtoras de anticorpos ou produtoras de memória (MESQUITA JÚNIOR *et al.* 2010; CRUVINEL *et al.* 2010; SORDILLO, 2018).

Os anticorpos no leite são sintetizados na própria glândula mamária ou são transportados da circulação sanguínea. Existem quatro classes de anticorpos conhecidos na defesa da glândula mamária contra bactérias causadoras de mastite, que são as imunoglobulinas (Ig) IgG1, IgG2, IgA e IgM (AITKEN, CORL e SORDILLO, 2011; SORDILLO, 2018).

As Ig (IgG1, IgG2 e IgM) podem atuar como opsoninas para aumentar a fagocitose por neutrófilos e macrófagos. A IgM também é eficiente na fixação do complemento. Já a IgA funciona na aglutinação bacteriana que pode impedir a

capacidade de certos patógenos de se espalharem pela glândula mamária, além de neutralizar algumas toxinas bacterianas. As Ig encontradas nas secreções lácteas influenciam significativamente no estabelecimento de novas infecções intramamárias (AITKEN, CORL e SORDILLO, 2011).

Na glândula saudável a concentração de Ig é baixa durante a lactação e aumenta durante a colostrogênese. A concentração de Ig aumenta também durante a inflamação e vai ser influenciada pelo grau de permeabilidade do tecido secretor e pelo número de células produtoras de Ig que estão presentes na glândula mamária naquele momento (AITKEN, CORL e SORDILLO, 2011; SORDILLO, 2018).

Assim como os LB presentes na glândula mamária, os LT desempenham um papel importante no sistema imunológico, pois são capazes de reconhecerem antígenos com alto grau de especificidade, de atuar como células efetoras e de regular a natureza e a intensidade da resposta imune (KIMURA *et al.* 1999; SORDILLO, 2018).

Os LT são classificadas em Alfa Beta ($\alpha\beta$) e Gama Delta ($\gamma\delta$) com base na presença ou ausência de marcadores antigênicos. Os LT $\alpha\beta$ são subdivididos em T-helper (CD4+) e T citotóxicas (CD8+) (TIZARD, 2008).

Algumas células, como por exemplo, os LT (CD4+), funcionam como sinalizador para ativar macrófagos, linfócitos e outras células do sistema imunológico. Em contrapartida, os LT (CD8+) exercem a função de eliminar bactérias, parasitas e células tumorais, além disso, produzem citocinas para inativar aspectos do sistema imunológico (KIMURA *et al.* 1999; BONNEVILLE *et al.* 2010).

Por algum tempo a função dos linfócitos na glândula mamária passou despercebida. Atualmente, sabe-se que os LT desempenham um importante papel na resposta imune em virtude da sua capacidade de reconhecer antígenos com alto grau de especificidade, para agir como células efetoras e para regular a natureza e a intensidade da resposta imune (LUN *et al.* 2007; RAINARD, CUNHA e GILBERT, 2016).

Os linfócitos T CD8⁺ estão presentes em maior quantidade do que os linfócitos T CD4⁺ no leite e glândula mamária de vacas (RIOLLET, RAINARD e POUTREL, 2001; MAGRO *et al.* 2017). O acúmulo de LT CD8⁺ nas proximidades do epitélio sugere que estas células atuam na manutenção da integridade da glândula mamária e na remoção das células infectadas ou danificadas (YAMAGUCHI *et al.* 1999; MAGRO *et al.* 2017).

Kimura *et al.* (1999), enfatizam que as mudanças no sistema imunológico em novilhas leiteiras periparturientes podem ser refletidas nas mudanças das populações de subconjuntos de células mononucleares do sangue periférico. Nesse período ainda é

observada a redução quantitativa e qualitativa da resposta imune celular dependente dos LT auxiliares (CD4⁺) e citotóxicos (CD8⁺).

Já Pomeroy *et al.* (2017), embora não tenham chegado a nenhuma conclusão concreta sobre a influência exata das subpopulações de monócitos no pós-parto, observaram que há uma relação entre a presença destas subpopulações de monócitos na susceptibilidade a doenças intramamárias e reprodutivas no pós-parto.

Em enfermidades crônicas, como é o caso da leucemia viral bovina (leucose), Doença de Johne e Micoplasmose bovina ocorrem uma disfunção dos LT (GOTO *et al.* 2017) e de forma resumida, pode-se dizer que a exaustão desses LT impede o controle ideal de infecções (WHERRY, 2011).

Wherry (2011), detalhou que os LT esgotados perdem suas funções efetoras e são fenotipicamente caracterizados pela expressão superficial de receptores imunoinibidores, como a proteína de morte programada 1 (PD-1). A PD-1 é expressa na superfície dos linfócitos ativados e o ligante de morte programada (PD-L1) é expresso amplamente em várias células, incluindo linfócitos, células dendríticas e monócitos.

A ligação dos sinais inibitórios entre PD-1 nas células interferem na sinalização dos LT e induzem imunossupressão. Portanto, diante do bloqueio da via PD-1 ocorre a reativação funcional dos LT, como proliferação e produção de citocinas *in vitro* (GOTO *et al.* 2017).

Outro tipo celular que emite um sinal inibitório é o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA- 4). Ele atua como um regulador negativo da função imune dos LT e pertence à família das imunoglobulinas (ROSHANRAVAN, HALLIDAY e SANSOM, 2017).

Juntamente com o PD-1, o CTLA- 4 atua como um ponto de controle (*checkpoint*) imunológico, que regula a ativação dos LT. Assim, acredita-se que as vias CTLA-4 e PD-1 atuam em diferentes estágios das respostas do sistema imunológico (BUCHBINDER e DESAI, 2016; ROUSHANRAVAN, HALLIDAY e SANSOM, 2017).

Cada vez mais, essas vias de regulação positiva são direcionadas como parte de estratégias imunomoduladoras para tratar cânceres e outras doenças crônicas (ROUSHANRAVAN, HALLIDAY e SANSOM, 2017). Em infecções da glândula mamária, como é o caso da mastite, a literatura apresenta-se escassa, principalmente em relação a função da PD-1 e CTLA – 4 em LT. Portanto, o presente estudo trata-se de uma ampla avaliação do periparto em novilhas, onde avaliou-se a saúde geral dos animais, condição corporal, parâmetros hematológicos, metabólicos e imunes, além da avaliação

minuciosa da glândula mamária.

2. ARTIGO 1

Artigo confeccionado conforme as normas do periódico “Revista Agrária Acadêmica (Anexo1)”.

AVALIAÇÃO DE β -HIDROXIBUTIRATO: UMA COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE TESTAGEM RÁPIDA E ENZIMÁTICO EM NOVILHAS PERIPARTURIENTES

Luana Carolina Bachmann Gregolin^{*1}, Maiara Garcia Blagitz², Marta Lizandra do Rêgo Leal³

^{1*} Mestranda no programa de Pós-graduação Saúde, Bem estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul – Universidade Federal da Fronteira Sul-UFFS, REALEZA/PR – BRASIL. E-mail: lubgregolin@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4135-1515

² Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – Realeza/PR – BRASIL.

³ Docente do Departamento de Clínica de Grandes Animais da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, SANTA MARIA/RS – BRASIL.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a acurácia dos resultados de dois métodos de avaliação eletrônicos portáteis de Beta-hidroxibutirato (BHB) e correlacionar com o método enzimático padrão ouro, verificando a possibilidade de substituir, de forma segura e confiável, o teste padrão ouro por testes portáteis e de fácil realização nas fazendas. Foram examinadas 150 amostras de sangue e soro colhidas de 30 novilhas em fase de periparto. Os momentos avaliativos foram quinze dias antes do parto (M1), no dia do parto M2, sete dias (M3), quinze (M4) e trinta dias após o parto (M5). Foram utilizados dois testes portáteis, um de uso humano (FreeStyle®) e outro de uso veterinário (KetoVet®), além do teste enzimático padrão ouro. Como resultados, o teste FreeStyle® demonstrou correlação muito forte ($r = 0,91$) com o método enzimático, enquanto o KetoVet® demonstrou uma correlação forte ($r = 0,88$). No teste T, as médias obtidas no padrão ouro e FreeStyle® foram iguais, enquanto que as médias entre KetoVet® e padrão ouro diferiram. Ainda avaliou-se a possibilidade de substituição dos testes através do teste de Bland Altman, que demonstrou que ambos os testes não substituem o padrão ouro. O dosímetro Free Style® pode ser utilizado na fazenda, com o intuito de facilitar e agilizar o diagnóstico, mas é necessário substituir o valor encontrado pelo aparelho na equação de regressão, facilitando assim para se obter um diagnóstico mais rápido na fazenda.

Palavras- chave: Cetose. Diagnóstico. Padrão ouro. Bovinos. Periparto.

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the accuracy of the results of two portable electronic evaluation methods for Beta-hydroxybutyrate (BHB) and correlate with the gold standard enzymatic method, verifying the possibility of safely and reliably replacing the gold standard test with portable and easy-to-perform on-farm tests. We examined 150 blood and serum samples collected from 30 heifers in the peripartum phase. The evaluation times were fifteen days before calving (M1), on the day of calving M2, seven days (M3), fifteen (M4) and thirty days after calving (M5). Two portable tests were used, one for human use (FreeStyle®) and another for veterinary use (KetoVet®), in addition to the gold standard enzyme test. As results, the FreeStyle® test showed a very strong correlation ($r = 0.91$) with the enzymatic method, while KetoVet® showed a strong correlation ($r = 0.88$). In the T-test, the means obtained in the gold standard and FreeStyle® were equal, while the means between KetoVet® and gold standard differed. The possibility of substituting the tests was also evaluated using the Bland Altman test, which showed that

both tests do not substitute for the gold standard. The Free Style® dosimeter can be used in the farm, in order to facilitate and speed up the diagnosis, but it is necessary to replace the value found by the device in the regression equation, thus facilitating a faster diagnosis in the farm

Keywords: Ketosis. Diagnosis. Gold standard. Cattle. Peripartum.

Introdução

O gado leiteiro é particularmente muito sensível à ocorrência de doenças (SAHAR *et al.* 2020). Um bom diagnóstico passa pela realização de uma anamnese detalhada, um exame físico preciso e completo e pela realização de exames complementares que auxiliem o clínico na tomada de decisões (DIRKSEN, GRUNDER e STOBER, 1993; FEITOSA, 2008). Para facilitar a realização de exames, cada vez mais estão sendo desenvolvidos dispositivos eletrônicos portáteis que têm como intuito amparar os profissionais da medicina veterinária para o diagnóstico correto das enfermidades (JACONDINO *et al.* 2019).

Esses dispositivos vêm para auxiliar médicos veterinários na rotina clínica de bovinos. São considerados essenciais e excelentes alternativas que ampliam a gama de ferramentas disponíveis para amparar e agilizar o diagnóstico das doenças, minimizando as perdas econômicas e produtivas e monitorando os animais em períodos críticos, como é o caso do periparto (MCART, NYDAM e OETZEL, 2012).

As enfermidades que ocorrem com alta frequência afetam negativamente a produção e o desempenho produtivo das vacas e devem ser uma preocupação relevante dentro da bovinocultura leiteira (COMPTOM *et al.* 2007, PARKER *et al.* 2007, FOX, 2009). Entre as principais doenças que ocorrem no periparto destacam-se a cetose, hipocalcemia, deslocamento de abomaso, retenção de placenta, infecções uterinas, afecções podais e mastite (VERGARA *et al.* 2014).

Segundo Abdeli *et al.* (2017), a doença que vem sendo identificada mundialmente em altos índices nos rebanhos leiteiros é a cetose, principalmente na forma subclínica. Esta é mais comum durante o pós-parto imediato e é descrita pelo aumento nas concentrações de corpos cetônicos na corrente sanguínea do animal, principalmente de β -hidroxibutirato (BHB) (PONCHEKI, 2019).

De acordo com alguns autores, o único método eficiente de detectar a cetose subclínica é a dosagem do BHB no sangue ou soro sanguíneo devido a sua estabilidade e predominância entre os corpos cetônicos circulantes (VANHOLDER *et al.* 2015; RUTHERFORD, OIKONOMOU e SMITH, 2016). É válido ressaltar que quando esse

exame é realizado a partir do soro sanguíneo há uma exigência de estrutura laboratorial, cuidados com o manuseio da amostra, demanda logística e tempo para emissão dos resultados (ALVARENGA *et al.* 2015).

Para auxiliar os médicos veterinários que trabalham longe dos centros diagnósticos e não tem acesso ao exame padrão ouro e até mesmo facilitar o diagnóstico na fazenda, possibilitando que o mesmo seja realizado de forma econômica, rápida e precisa, vários dispositivos eletrônicos portáteis vêm sendo desenvolvidos e comercializados com intuito de substituir o método enzimático que é considerado padrão ouro (JACONDINO *et al.* 2019). Dentre eles, alguns dispositivos com princípio de aferir glicemia na medicina humana são utilizados na Medicina Veterinária para a determinação da concentração de BHB em rebanhos leiteiros (FIORENTIN *et al.* 2017). Apesar de não serem específicos para bovinos, estes apresentam bons resultados (SOUZA *et al.* 2015). Da mesma forma, existem alguns aparelhos que já foram desenvolvidos especificamente para a Medicina Veterinária (SCHEIDER *et al.* 2020).

Com isto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a acurácia dos resultados de dois métodos de avaliação eletrônicos portáteis de BHB e correlacionar com o método enzimático padrão ouro. Além de verificar a possibilidade de substituir, de forma segura e confiável, o teste padrão ouro, auxiliando na economia, praticidade e identificação de animais ou rebanhos com cetose.

Materiais e métodos

Comitê de Ética em Pesquisa.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS (nº 8290280720, 5403300919 e 6321041021).

Animais utilizados, manejo nutricional e instalações

O estudo foi realizado de outubro de 2020 a julho de 2021 em duas fazendas leiteiras localizadas no município de Salto do Lontra (PR). Ambas em sistema de

produção confinado, uma manejada no sistema *Compost Barn* (F1) e a outra *Free Stall* (F2).

A propriedade mantida em sistema *Compost Barn* contava com 120 vacas da raça Holandês Preto e Branco (HPB) em lactação, com média diária de 39 litros de leite. A propriedade do sistema *Free Stall* contava com 80 animais em lactação e a média diária leiteira era de 35 litros por vaca.

Ambas as propriedades adotavam manejo alimentar semelhante. No período entre 60 e 30 dias antes do parto, os animais se alimentavam de silagem de milho, pré-secado de aveia, ração comercial, farelo de soja e mineral comercial. Ainda no período pré-parto, aproximadamente 30 dias antes do parto, os animais passavam a se alimentar com silagem de milho, feno e ração, preparada na propriedade, composta por farelo de soja, casquinha de soja, mineral pré-parto (Milk Sacc[®], Alltech, Kentucky, EUA).

Foram pré-selecionados animais hígidos e sem histórico recente de enfermidades.

Momentos de avaliação e coleta de amostras sanguíneas

Para avaliação do BHB foram utilizadas 30 novilhas em fase de periparto, destas 20 novilhas da F1 e 10 da F2, das quais foram coletadas 150 amostras de sangue. Foram preconizados diferentes momentos de avaliação: Momento 1 (M1) – quinze dias antes do parto, Momento 2 (M2) – dia do parto, Momento 3 (M3) – sete dias, Momento 4 (M4) – quinze dias e Momento 5 (M5) – trinta dias após o parto.

O sangue foi coletado por punção a veia coccígea usando o sistema Vacutainer[®] (BD, New Jersey, EUA), por meio de agulhas 25x10 e tubos plásticos com EDTA e com capacidade de 5 mL para mensurar beta-hidroxibutirato (BHB) por meio dos métodos portáteis eletrônicos. Para dosagem enzimática de BHB foram utilizados tubos plásticos sem anticoagulante com capacidade de 10 mL.

Os tubos com material sanguíneo foram acondicionados em caixas isotérmicas, na temperatura de 4°C e encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU) da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*.

Laboratório

Foram realizadas as mensurações dos teores de BHB com auxílio dos dosímetros portáteis FreeStyle Optium β -ketone[®] (Abbott Diabetes Care, Oxfordshire, Reino Unido) e Ketovet[®] (TaiDoc Technology Corporation, New Taipei City, Taiwan). Para isso, o tubo com EDTA foi homogeneizado e com auxílio de um capilar, uma gota de sangue foi colocada sobre as fitas de cada um dos testes conforme as instruções de cada fabricante. Os resultados foram exibidos na tela após dez segundos no FreeStyle[®] e cinco segundos no Ketovet[®]. Os valores de cada momento foram registrados na ficha individual de cada animal.

As amostras dos tubos sem anticoagulante foram centrifugadas a 4330 x g, por dez minutos. O soro obtido foi separado, armazenado em tubos tipo Eppendorf, identificados e conservados em freezer - 80 °C para posterior dosagem do BHB de forma enzimática.

Na avaliação de BHB no soro foi utilizada a metodologia enzimática colorimétrica, considerada padrão ouro para essa análise (RAIMONDO *et al.* 2011; JACONDINO *et al.* 2019; CARVALHO *et al.* 2020). O kit comercial utilizado foi o Ranbut D-3- Hydroxybutyrate[®] (Randox Laboratories Ltda - RB1007, County Antrim, Reino Unido). O exame foi realizado em analisador bioquímico automático Labtest[®] (Labmax 240, Japão – Tokyo Boeki Medical System Ltda).

Análise estatística

Para a comparação entre os diferentes exames de BHB (Ketovet[®], FreeStyle[®] ou Analisador automático) em relação ao momento de coleta (-15, Parto, 7, 15 e 30 dias pós-parto), a estatística descritiva foi representada pela média aritmética e erro padrão da média (EPM). Estes dados foram obtidos por meio do procedimento Means programa SAS, versão 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

A estatística de inferência foi realizada como medidas repetidas no tempo, por meio de análise de variância (ANOVA), comparando-se as médias de BHB de todos os animais (n = 30), de acordo com os diferentes exames, entre os diferentes momentos de coleta (n = 5). O modelo estatístico foi composto pelas variáveis classificatórias (Exame, Tempo e interação Exame*Tempo), uma variável aleatória (animal dentro de tempo, i.e. Animal (Tempo) e as variáveis-resposta (BHB).

A comparação entre as médias dos grupos de tempo foi realizada por meio do teste de médias Tukey, mediante o comando *Least Square Means (LSMeans)* do SAS. Foi utilizado o nível de significância de 5% para todos os testes realizados. Os gráficos foram confeccionados no programa Sigmaplot versão 12.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany).

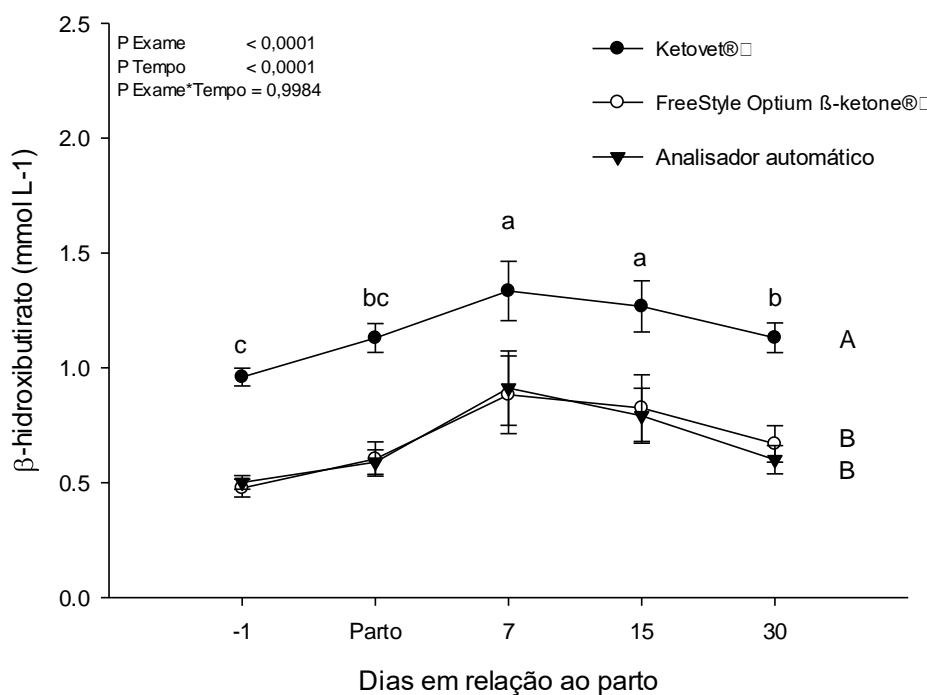
Para a obtenção do coeficiente de correlação ($r = rho$) entre o BHB obtido nos diferentes exames foi realizada a correlação de Pearson, por meio do procedimento *Corr Rank* do SAS 9.3. Quanto a avaliação qualitativa do coeficiente de correlação, considerou-se: quando for menor do que 0,30 existe uma correlação linear fraca; de 0,30 a 0,60, moderada; entre 0,60 a 0,90 a correlação é forte e acima de 0,90 a correlação linear é considerada muito forte (CALEGARI-JACQUES, 2003).

Para a elaboração das equações e dos gráficos de regressão, bem como a predição dos valores de BHB do padrão ouro (Analisador automatizado), usando os dois testes rápidos (Ketovet® e FreeStyle®), foi utilizado o programa Sigmaplot versão 12.0. As análises de regressão foram expressas como curvas de regressão linear simples. A concordância entre os métodos foi verificada usando o gráfico de diferenças de Bland – Altman (BLAND e ALTMAN, 1986) com intuito de verificar qual(is) dos métodos testados poderia(m) substituir o padrão ouro.

Resultados e discussões

Os dados desse estudo podem ser observados na Tabela 1 e nos Gráficos de 1 a 5. Como resultado das médias obteve-se os valores demonstrados no Gráfico 1, onde as médias e diferenças estatísticas estão descritas.

Gráfico 1. BHB (médias \pm EPM) e valores de *P* (Exame, Tempo e Exame*Tempo) obtidos nos cinco momentos de avaliação através do teste automático e aparelhos portáteis Free Style[®] e KetoVet[®]



Legenda: * Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os testes avaliados. Letras minúsculas diferentes, indicam diferença entre os momentos avaliados.

Na análise dos dados mediante realização do teste de correlação de Pearson observou-se correlação positiva entre os teores de BHB oriundos do aparelho portátil Free Style[®] (FS) e aqueles obtidos pelo teste automático padrão ouro ($r = 0,95$; $P < 0,001$) (Tabela 1). Esta correlação foi considerada muito forte e com alta significância estatística, utilizando-se do critério de classificação indicado por Callegari-Jacques, (2003).

Tabela 1. Resultados da correlação de Pearson obtidos na comparação entre os métodos de avaliação de BHB dos aparelhos KetoVet[®], Free Style[®] e Automático.

		Ketovet	Free Style	Automatizado
Ketovet [®] (KV)	R	1		
	P		-	-
	n	146		
Free Style [®] (FS)	R	0,91787	1	
	P	< 0,0001		-
	N	146	146	
Automatizado (AUT)	R	0,88965	0,95426	1
	P	< 0,0001	< 0,0001	
	N	146	146	146

* Valores das correlações = menor do que 0,30 correlação linear fraca; de 0,30 a 0,60 moderada; entre 0,60 a 0,90 forte e acima de 0,90 muito forte. r = coeficiente de correlação de Pearson. P = nível de significância. n = número amostral.

Outras pesquisas também detectaram valores altos na correlação usando outros dosímetros portáteis humanos, como o estudo realizado por Voyvoda e Erdogan, (2010). Estes autores, ao trabalharem com vacas leiteiras, encontraram o coeficiente de correlação (r) com o aparelho Optium Xceed[®] de 0,97 comparando com o método laboratorial padrão ouro. Em estudo realizado com ovinos, Panousis *et al.* (2011), também detectaram correlação linear muito forte ($r = 0,99$) entre o Optium Xceed[®] e o método considerado padrão ouro (enzimático).

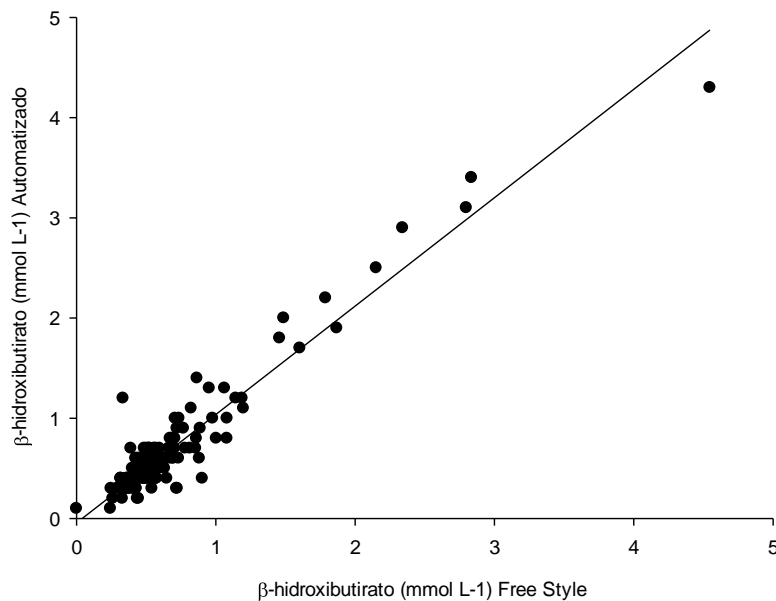
Entretanto, a correlação existente entre o AUT e KetoVet[®] (KV) foi de $r = 0,88$ e $P < 0,001$. Esta foi considerada forte, mas menor quando comparada ao aparelho humano. Quando o intuito é analisar um procedimento analítico, o mesmo deve apresentar uma correlação muito forte com o padrão ouro. Porém, quando o procedimento analítico apresentar uma correlação forte apenas, sugere que ele pode produzir valores diferentes do verdadeiro (BLAND e ALTMAN, 1986; KANEKO *et al.* 2008).

Uma vez constatado que existe correlação linear entre duas variáveis, pode-se prever o comportamento de uma delas em função da variação da outra (MONTGOMERY e RUNGER, 2003). Assim, determina-se o R^2 , onde é possível visualizar o encontro dos eixos x e y e consequentemente avaliar o quanto uma medida determina a outra.

A correlação linear simples feita entre os testes automatizado e Free Style[®] obteve $R^2 = 0,91$ ou 91% e valor de $P < 0,0001$, altamente significativo (Gráfico 2). Isso explica que quando mais próximo esse valor obtido for de 1, maior o grau de relacionamento

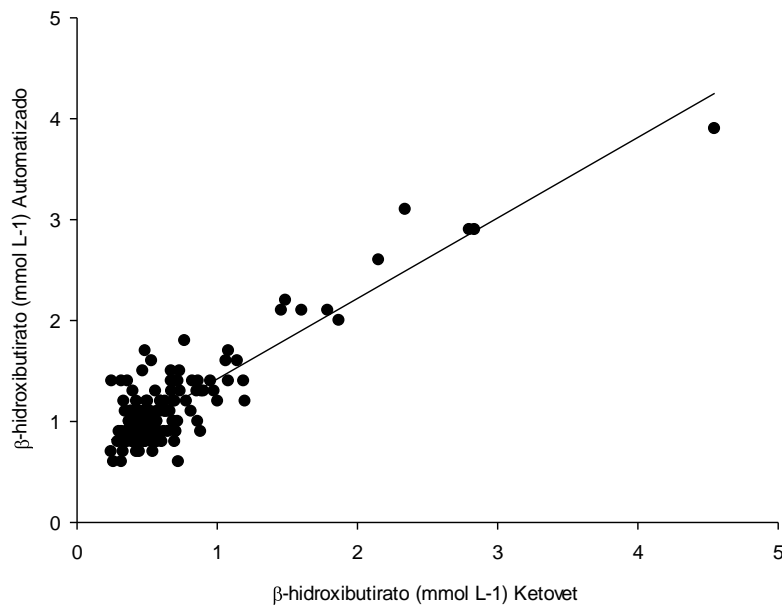
linear positivo entre as variáveis x e y (BARBETA, REIS e BORNIA, 2004). As variações da variável y (AUT) são 91% explicadas pelas variações da variável x (FS).

Gráfico 2. Curva de regressão linear simples entre o aparelho Automatizado e Free Style®. Equação = $0.0969 + (0.842 * \text{Free Style}^{\circledast})$. $R^2 = 0.9110$; $P < 0.0001$.



Quando a curva de correlação linear simples foi utilizada com os dados do KV e AUT, o valor de R^2 obtido foi de 0,78 ou 78% e $P < 0.0001$ (Gráfico 3). Esses valores demonstram uma variação maior entre o padrão ouro e o teste desenvolvido para bovinos. Jacondino *et al.* (2019) também não obtiveram bons resultados utilizando o aparelho veterinário (KV) em ovelhas e preconizaram o uso de dosímetro humano como teste rápido para avaliar os teores de BHB em ovinos.

Gráfico 3. Curva de regressão linear simples entre o aparelho Automatizado e KetoVet®. Equação = $-0.473 + (0.989 * \text{KetoVet})$; $R^2 = 0.7890$; $P < 0.0001$.

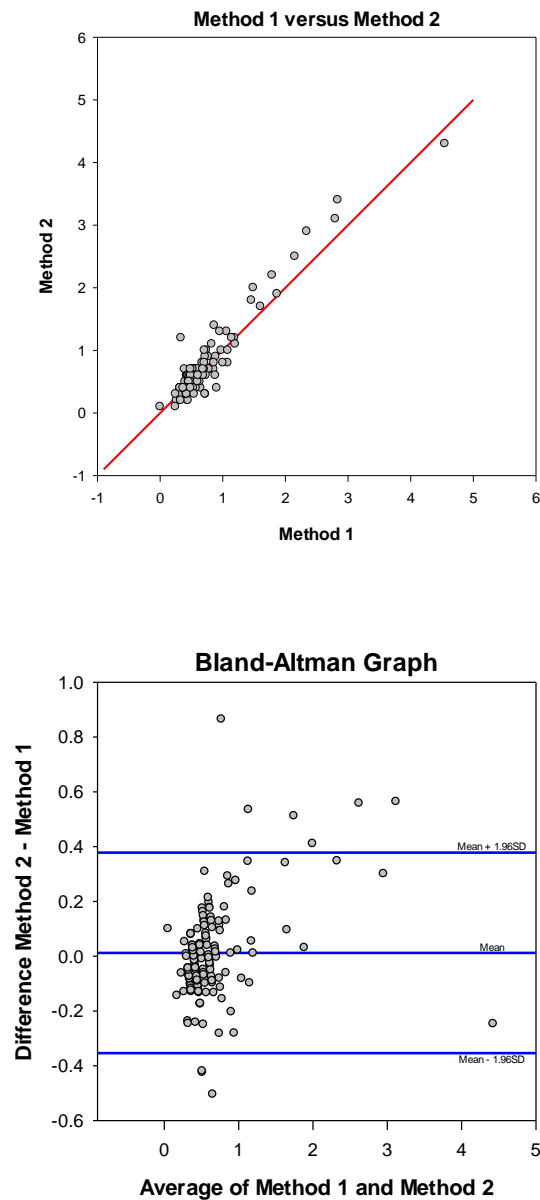


Mesmo com um valor de correlação alta entre o dosímetro humano e padrão ouro, ainda não é possível afirmar que o aparelho FS substitui de forma eficiente e segura o método enzimático. Para verificar isso, foi necessário realizar o teste de Bland Altman, considerado um teste de predição, mostrando com mais confiabilidade se pode-se substituir o padrão ouro pelo FS (BLAND e ALTMAN, 1986).

Inicialmente, a média e desvio padrão foram calculados dos resultados de cada aparelho portátil e automático. Nesse caso a média obtida nas 146 amostras realizadas pelo AUT foi $0,68 \pm 0,53$, enquanto do FS foi $0,69 \pm 0,61$. A partir disso foi realizado um teste T. Como resultados obtivemos $P = 0,73$. Estes resultados demonstram que os métodos padrão ouro e FS são semelhantes.

Os gráficos de Bland - Altman não mostraram diferença significativa entre os dois métodos para as amostras. No entanto, apesar da igualdade entre os testes, há um viés de proporção, onde o FS acaba gerando alguns valores maiores que o teste padrão ouro. Nesse caso, não substitui o teste padrão ouro, podendo ser usado na fazenda desde que o valor obtido seja substituído na equação (Equação = $-0.473 + (0.989 * \text{valor obtido no aparelho})$) (Gráfico 4), facilitando assim um diagnóstico mais rápido na fazenda.

Gráfico 4. Comparação entre medidor portátil Free Style® e Automatizado para medição de BHB em amostras de sangue de 30 novilhas. (A) Gráfico de diferenças de Bland Altman. (B) Gráfico de dispersão de Bland Altman.



Teste T para 1 grupo – comparação da diferença entre os testes com o zero ($H = 0$). A hipótese é que a mediana seja 0 pra não haver diferença entre os testes ($P > 0,05$).

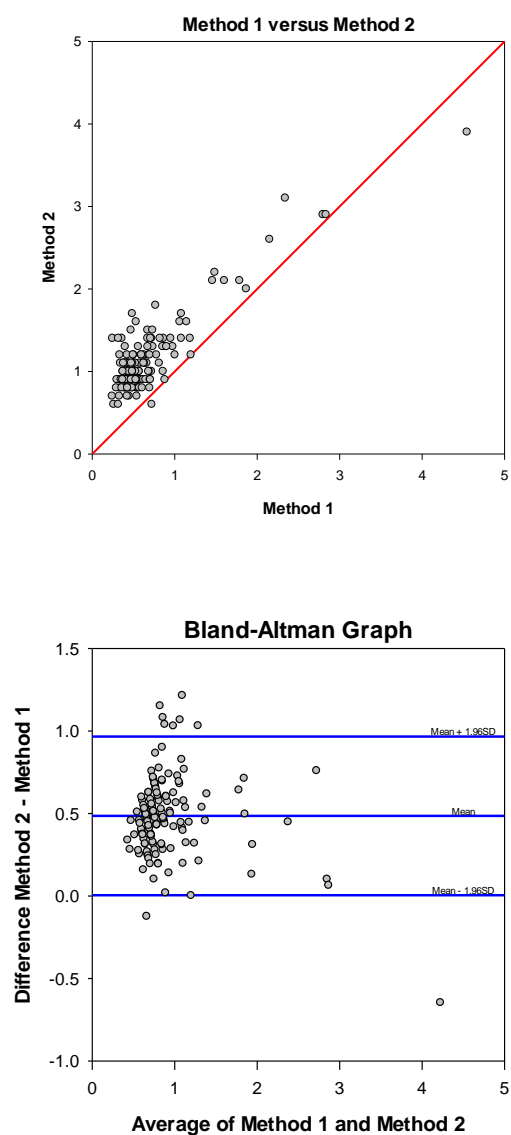
Dif =: $-0,01 \pm 0,19$; Intervalo de confiança de 95%: -0.0140 to 0.0440 ; $P = 0.731$

Dif = $0.0754 - (0.128 * \text{Média})$ $P < 0,0001$ (tem viés de proporção).

Voyvoda e Erdogan (2010) também utilizaram o gráfico de diferença de Bland – Altman com intuito de comparar o aparelho Optium Xceed® com o padrão ouro e da mesma forma que na presente pesquisa, puderam verificar um pequeno viés entre os testes, onde o aparelho humano apresentou valores mais altos que o padrão ouro, novamente concordando com a presente pesquisa.

Quando comparado o teste automático com o KV, as médias e desvio padrão obtidos foram $0,68 \pm 0,53$ mmol/L no automático e para o KetoVet[®] $1,17 \pm 0,48$ mmol/L. No teste T, a diferença obtida foi $P = 0,0001$, afirmando que os métodos padrão ouro e KV diferem entre si. A regressão linear simples indica que tem viés de proporção e mostra que o KV além de apresentar valores diferentes, gera números maiores que os dosados no método automatizado (Gráfico 5).

Gráfico 5. Comparação entre medidor portátil KetoVet[®] e Automatizado para medição de BHB em amostras de sangue de 30 novilhas. (A) Gráfico de diferenças de Bland Altman. (B). Gráfico de dispersão de Bland Altman.



Teste T para 1 grupo – comparação da diferença entre os testes com o zero ($H = 0$) A hipótese é que a mediana seja 0 pra não haver diferença entre os testes ($P \leq 0,05$).

Dif =: $-0,49 \pm 0,25$; Intervalo de confiança de 95%: -0.514 to -0.448 ; $P < 0,0001$.

Dif = $-0.590 + (0.114 * \text{Média})$ $P = 0.006$ (tem viés de proporção).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em uma de suas resoluções, a RDC nº185, sobre o registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos, recomenda que 95% das medidas obtidas em aparelhos portáteis ou afins, permaneçam dentro de $\pm 20\%$ do método padrão-ouro (BRASIL, 2001).

Souza *et al.* (2015), obtiveram a média com o método padrão ouro de $0,95 \pm 0,44$ mmol/L, enquanto a média obtida pelo KetoVet® foi de $1,09 \pm 0,47$ mmol/L. Neste estudo, o resultado obtido a partir da diminuição entre as médias dos equipamento KetoVet® e padrão ouro foi de 13%, ficando dentro do limite recomendado para padronização das medidas utilizado pela RDC nº 185 (BRASIL, 2001). Na presente pesquisa, o resultado da diminuição entre as médias foi 49%, ficando muito acima do que é recomendado pela resolução da ANVISA.

Conclusão

Os resultados dessa pesquisa mostram que apesar de existir uma correlação forte entre os testes, ainda assim, não recomenda-se a substituição do teste enzimático padrão ouro pelos dosímetros portáteis Free Style® e KetoVet®. O dosímetro Free Style® pode ser utilizado na fazenda com o intuito de facilitar e agilizar o diagnóstico, mas é necessário substituir o valor encontrado pelo aparelho na equação de regressão, facilitando assim um diagnóstico mais rápido e funcionando como um exame de triagem.

Referências

ABDELI, A. *et al.* Elevated non-esterified fatty acid and β -hydroxybutyrate in transition dairy cow and their association with reproductive performance and disorders: a meta-analysis. **Theriogenology**, v.93, p.99-104, 2017.

ALVARENGA, E. A. *et al.* Avaliação do perfil metabólico de vacas da raça Holandesa durante o período de transição. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.3, p.281-290, 2015.

BARBETTA, P.A.; REIS, M.M.; BORNIA, A.C. **Estatística para os cursos de engenharia e informática**. São Paulo: Atlas, 2004. 410p.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 185, de 22 de outubro de 2001. Registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA Publicações Eletrônicas. 2001. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/rdc0185_22_10_2001.pdf. Acesso em: 30/03/2022.

BLAND, J. M., ALTMAN, D. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet**, v. 327, n.8476, p. 307-310, 1986.

CALLEGARI-JACQUES, S. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 255p.

CARVALHO, J. S. *et al.* Validation of the Freestyle® Optium Neo portable meter for glucose determination in ewes with single and twin pregnancies. **Revista Agrária Acadêmica**, v. 3, n.3, p. 119-128, 2020.

COMPTON, C. W. R. *et al.* 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.

DIRKSEN, G. GRUNDER, H.; STOBER, M. **Rosemberger, Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1993.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: A arte do diagnóstico**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2008.

FIORENTIN, E. *et al.* Accuracy of two hand-held electronic devices for determination of blood β -hydroxybutyrate in dairy cows. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.18, n.3, p. 439–445, 2017.

FOX, L. K. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. **Veterinary microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 82-88, 2009.

JACONDINO, L. R. *et al.* Comparação de métodos para avaliação de beta-hidroxibutirato em ovelhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 857-862, 2019.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 8^a ed. San Diego: Academic Press, 2008. 916p.

MCART, J. A. A.; NYDAM, D. V.; OETZEL, G. R. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, n. 9, p. 5056-5066, 2012.

MONTGOMERY, D.C., RUNGER, G.C. **Estatística Aplicada e Probabilidade Para Engenheiros**, 2 ed., Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos, 2003. 463p.

PANOUSIS, N. *et al.* Evaluation of Precision Xceed® meter for on-site monitoring of blood β -hydroxybutyric acid and glucose concentrations in dairy sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 435-439, 2012.

PARKER, K. *et al.* Management of dairy heifers and its relationships with the incidence of clinical mastitis. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 55, n.5, p.208–216, 2007.

PONCHEK, J. K. **Beta-hidroxibutirato e perfil de ácidos graxos do leite bovino no início da lactação: efeitos sobre produção, reprodução e sanidade**. 2019. 113 f. Tese (Doutorado) - Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

RAIMONDO, R.F.S. *et al.* Uso de sensor portátil para a mensuração de glicose e β -hidroxibutirato no sangue de bovinos leiteiros. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, p.389-393, 2011.

RUTHERFORD, A. J., OIKONOMOU, G e SMITH, R. F. The effect of subclinical ketosis on activity at estrus and reproductive performance in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n.6, p.4808–4815, 2016.

SAHAR, M. W. *et al.* Predicting disease in transition dairy cattle based on behaviors measured before calving. **Animals**, v. 10, n. 6, p. 928, 2020.

SCHNEIDER, R. F. *et al.* Diagnóstico de cetose em vacas leiteiras, em diferentes sistemas de produção, por Optium Xceed® e Ketovet®. **PUBVET** v.14, n.11, a688, p.1-7, 2020.

SOUZA, R. C. *et al.* Uso de aparelho portátil para determinar a concentração de cetose no sangue de bovinos. **Revista V&Z**, v. 26, p.2179-9482, 2015.

VANHOLDER, T. *et al.* Risk factors for subclinical and clinical ketosis and association with production parameters in dairy cows in The Netherlands. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.2, p.880-888, 2015.

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.

VOYVODA, H; ERDOGAN, H. Use of a hand-held meter for detecting subclinical ketosis in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 3, p. 344-351, 2010.

3. ARTIGO 2

Artigo confeccionado conforme as normas do periódico “Revista Agrária Acadêmica (Anexo1)”.

PARAMÊTROS METABÓLICOS E DETERMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA PARA DIAGNÓSTICO DE MASTITE ATRAVÉS DE MALDI-TOF EM NOVILHAS PERIPARTURIENTES

Luana Carolina Bachmann Gregolin*¹, Maiara Garcia Blagitz², Marta Lizandra do Rêgo Leal³

^{1*} Mestranda no programa de Pós-graduação Saúde, Bem estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul – Universidade Federal da Fronteira Sul-UFFS, REALEZA/PR – BRASIL. E-mail: lubgregolin@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4135-1515.

² Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – Realeza/PR – BRASIL.

³ Docente do Departamento de Clínica de Grandes Animais da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, SANTA MARIA/RS – BRASIL.

Resumo

O objetivo dessa pesquisa foi verificar a ocorrência das alterações metabólicas em novilhas e avaliar a sua implicação na ocorrência de mastite no periparto. Foram examinadas 30 novilhas da raça Holandesa, provenientes de duas fazendas leiteiras. Os animais foram avaliados em cinco momentos distintos, que foram quinze dias antes do parto (M1), no dia do parto M2, sete dias (M3), quinze (M4) e trinta dias após o parto (M5). No M1 houve a avaliação hematológica e apenas sangue foi coletado. A partir do M2, amostras de leite e sangue foram coletadas para avaliação hematológica e avaliação da ocorrência de mastite. Houve a avaliação da glândula mamária e identificação de microrganismos foi realizada por MALDI-ToF MS. Foram isolados 25 patógenos diferentes em 64,37% dos quartos mamários avaliados. Os resultados metabólicos permaneceram em grande parte dos animais dentro do valor esperado. As alterações metabólicas do presente estudo não influenciaram na ocorrência de mastite. Houveram algumas alterações em casos isolados, mas de maneira geral os animais apresentaram bons resultados nos exames. Um manejo nutricional adequado, aliado a um bom manejo de ordenha se tornam essenciais para diminuição das taxas de doenças no periparto.

Palavras chave: Periparto. Produção de leite. Enfermidades. Metabolismo.

Abstract

The objective of this research was to verify the occurrence of metabolic alterations in heifers and evaluate their implication in the occurrence of mastitis in the peripartum. Thirty Holstein heifers from two dairy farms were examined. The animals were evaluated in five different moments, which were fifteen days before parturition (M1), on the day of parturition (M2), seven days (M3), fifteen (M4) and thirty days after parturition (M5). At M1 there was hematological evaluation and only blood was collected. From M2 on, milk and blood samples were collected for hematological evaluation and mastitis evaluation. There was evaluation of the mammary gland and identification of microorganisms was performed by MALDI-ToF MS. Twenty-five different pathogens were isolated in 64.37% of the evaluated mammary quarters. Metabolic results remained within the expected value in most animals. The metabolic alterations in the present study did not influence the occurrence of mastitis. There were some alterations in isolated cases, but in general the animals showed good results in the tests. An adequate nutritional management, allied to a

good milking management are essential to reduce the rates of diseases in the peripartum.

Key words: Peripartum. Milk production. Diseases. Metabolism.

Introdução

As novilhas são importantes fontes de reposição de matrizes nos rebanhos leiteiros (SANTOS e LOPES, 2014). Antes do primeiro parto elas representam alto custo dentro de uma propriedade, pois durante este período não oferecem nenhum retorno financeiro e produtivo. Dessa forma, quando há ocorrência de mastite em novilhas os proprietários sofrem com altos prejuízos econômicos e produtivos (FOX, 2009).

De modo geral, as novilhas e vacas leiteiras têm maior susceptibilidade para a incidência de doenças metabólicas e infecciosas com maior gravidade durante o período periparto (SORDILLO, 2016). Os problemas de saúde que ocorrem na época do parto são especialmente preocupantes, pois afetam a eficiência produtiva atual e nas futuras lactações (FOX, 2009; SORDILLO, 2016).

Em um estudo realizado por Berge e Vertenten (2014), estes autores compararam a incidência clínica de doenças metabólicas *versus* mastite clínica e evidenciaram uma diferença considerável, dos quais 10% apresentaram distúrbios metabólicos e 40% mastite clínica. Nessa mesma pesquisa, a prevalência de comprometimento metabólico de forma subclínica é acima de 30%, tornando-se uma preocupação para a saúde das vacas nas fazendas leiteiras (BERGE e VERTENTEN, 2014; DONADEU *et al.* 2020).

Entre as principais enfermidades metabólicas do periparto estão a cetose, hipocalcemia e hipomagnesemia (FUKUSHIMA *et al.* 2020). Essas enfermidades tem a sua ocorrência impulsionada pelo balanço energético negativo (BEN) no início da lactação. Ele ocorre devido a diminuição da ingestão de matéria seca nos momentos que antecedem o parto, favorecendo ao que provavelmente é um dos principais problemas com a homeostase metabólica em vacas leiteiras (MIKULA *et al.* 2021).

Como resultado, o BEN ainda pode comprometer o sistema imune dos animais. Isso pode favorecer a capacidade de colonização da glândula mamária por parte dos microrganismos, enfatizando a importância do monitoramento das doenças metabólicas e mastite no periparto (ARCANJO *et al.* 2017; FERREIRA *et al.* 2015).

Grande parte das pesquisas avalia o BEN e suas implicações em vacas multíparas. Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi verificar a ocorrência das alterações metabólicas em novilhas e avaliar a sua implicação na ocorrência de mastite no periparto.

Materiais e métodos

Comitê de Ética em Pesquisa.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS (nº 8290280720, 5403300919, 6321041021).

Animais utilizados, manejo nutricional e instalações

O período de realização desse estudo foi de outubro de 2020 a julho de 2021 e foi desenvolvido em duas fazendas leiteiras localizadas no município de Salto do Lontra (PR), em sistema de produção confinado, uma manejada no sistema *Compost de Barn* (F1) e a outra no *Free Stall* (F2).

A propriedade mantida em sistema *Compost Barn* contava com 120 animais em lactação com média de produção leiteira de aproximadamente 39 litros por vaca. A propriedade do sistema *Free Stall* contava com 80 animais em lactação e a média de produção 35 litros diários por vaca.

Ambas as propriedades adotavam manejo alimentar semelhante. No período entre 60 e 30 dias antes do parto, os animais se alimentavam de silagem de milho, pré-secado de aveia, ração comercial, farelo de soja e mineral comercial. Ainda no período pré-parto, aproximadamente 30 dias antes do parto, os animais passavam a se alimentar com silagem de milho, feno e ração, preparada na propriedade, composta por farelo de soja, casquinha de soja, mineral pré-parto (Milk Sacc[®], Alltech, Kentucky, EUA).

Foram pré-selecionados animais hígidos e sem histórico recente de enfermidades e em todos os momentos o escore de condição corporal foi avaliado por um único avaliador, conforme os critérios Edmonson *et al.* (1989), em uma escala de 1 a 5 (EDMONSON *et al.* 1989).

Momentos de avaliação e coleta de amostras de sangue

As coletas de sangue foram realizadas em datas específicas, das quais o primeiro momento foi aproximadamente 21 dias antes do parto (Momento 1 – M1) e apenas amostras sanguíneas foram coletadas. Na sequência, após a parição dos animais, as amostras foram colhidas no dia do parto (Momento 2 – M2), sete dias após o parto (Momento 3 – M3), quinze dias após o parto (Momento 4 – M4) e trinta dias após o parto (Momento 5 – M5).

O sangue foi coletado por punção a veia coccígea usando o sistema vacutainer® (BD, New Jersey, EUA), por meio de agulhas 25x10 e tubos plásticos sem anticoagulante com capacidade de 10 mL. Estes foram utilizados para análises bioquímicas. Tubos com anticoagulante fluoreto foram utilizados e destinado para mensuração de glicose.

Os tubos com material sanguíneo foram acondicionados em caixas isotérmicas, na temperatura de 4 °C e encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU) da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*.

Momentos de avaliação e coleta de amostras de leite

As coletas de leite foram realizadas no dia do parto (Momento 2 – M2), sete dias após o parto (Momento 3 – M3), quinze dias após o parto (Momento 4 – M4) e trinta dias após o parto (Momento 5 – M5).

Para a coleta de leite, os animais foram conduzidos até a sala de espera e após entrarem na sala de ordenha foi iniciado o procedimento para a coleta de leite. Inicialmente a glândula mamária foi examinada a fim de visualizar alguma alteração. Posteriormente os quartos foram higienizados com solução *pré-dipping*, seguido pelo teste da caneca de fundo escuro, onde os três primeiros jatos de leite foram descartados e avaliados conforme os critérios estabelecidos por Birgel (2014), observando a cor, consistência e presença de massas ou grumos da secreção. Novamente os quartos foram emergidos em solução *pré-dipping* e após trinta segundos secados com toalha de papel individualmente.

As amostras de leite foram colhidas em duas alíquotas por quarto no M2, M3, M4 e M5 para o exame microbiológico. O leite foi colhido assepticamente conforme as recomendações de Harmon *et al.* (1990) e do *National Mastitis Council* (NMC) (2004), em duas alíquotas em tubos plásticos estéreis para cada quarto mamário. Os tubos estavam devidamente identificados e tinham capacidade de 5 mL. Após a coleta as

amostras foram alocadas em caixas isotérmicas, com temperatura controlada de 4° até a chegada no laboratório, onde foram armazenadas em freezer com temperatura de -20°C até a realização do exame microbiológico e identificação bacteriana pela técnica MALDI-TOF, conforme as recomendações de Barreiro *et al.* (2010 e 2017).

Acompanhamento e avaliação da incidência de mastite clínica na propriedade

Durante o período do estudo, em todas as ordenhas, foi realizado o exame de fundo escuro e qualquer alteração na substância láctea, como mudança na coloração, consistência e presença de massas ou grumos foi registrada.

Análise bioquímica

Para essas análises foram utilizados tubos sem anticoagulante. Estas amostras foram centrifugadas a 4330 x g, por dez minutos para obtenção do soro. O soro obtido foi separado em seis eppendorfs com capacidade de 2 mL e destinado as dosagens de proteínas totais (K031-1 Bioclin), ureia (K056-1 Bioclin), creatinina (K067-1 Bioclin), gama glutamil transferase (GGT) (K080-2 Bioclin), alanina aminotransferase (ALT) (K049-6 Bioclin), aspartato aminotransferase (AST) (K048-6 Bioclin), cálcio (K051-2 Bioclin), fósforo (K068-1 Bioclin), colesterol (K083-3 Bioclin) triglicerídeos (K117-1 Bioclin). As amostras de sangue colhidas em frascos com anticoagulante fluoreto foram destinadas para a dosagem de glicose (Bioclin – Ref. K082-2). Todas as análises foram realizadas conforme a indicação do kit comercial em analisador bioquímico semiautomático Mindray – BA 88 A.

A dosagem de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (RANDOX® - FA115) e beta hidroxibutirato (BHB), (RANDOX® - RB1007), Randox®, Laboratories Ltda - Reino Unido também foi realizada. Esses, foram executados em analisador bioquímico automático Labtest® (Labmax 240, Japão – Tokyo Boeki Medical System Ltda) conforme descrito pelo fabricante.

Exame bacteriológico do leite

MALDI-ToF MS

As amostras de leite foram encaminhadas ao laboratório Qualileite da Faculdade

de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde a identificação dos possíveis agentes causadores de mastite subclínica foi pela técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa seguindo as recomendações de Barreiro *et al.* (2010 e 2017).

Estatística

Todos os dados foram digitados em uma base de dados e verificados duas vezes para erros de entrada. Análise descritiva de dados incluiu a computação de mediana, com intervalo interquartil e para populações de células individuais e frequência de variáveis do tipo categórico. Os dados foram descritos usando técnicas descritivas e gráficas. Análise foi realizada utilizando o programa de software SAS 9.4 (SAS Institute).

Vários modelos logísticos multivariáveis foram usados para avaliar a relação entre os resultados dos exames metabólicos e distribuição binária para a variável resultado (presença de mastite, sim ou não).

Resultados e discussão

Os resultados da avaliação da condição corporal dos animais nos diferentes momentos estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1 – Médias dos escores de avaliação da condição corporal e desvio padrão (σ).

	M1	M2	M3	M4	M5
ECC	3,1 ^a ($\pm 0,5$)	2,7 ^b ($\pm 0,4$)	2,5 ^c ($\pm 0,3$)	2,4 ^d ($\pm 0,2$)	2,5 ^c ($\pm 0,1$)

Legenda: M1 = momento 1 (quinze dias antes do parto), M2 = momento 2 (dia do parto), M3= momento 3 (sete dias após o parto), M4= momento 4 (quinze dias após o parto), M5= momento 5 (trinta dias após o parto). ECC: escore de condição corporal. *Letras diferentes na mesma linha representam diferença entre as médias ($P \leq 0,05$).

O ECC (escore de condição corporal) é um importante marcador da saúde das vacas e é uma ferramenta essencial para monitorar o estado nutricional de rebanhos leiteiros (HEUER, SCHUKKEN e DOBBELAAR, 1999). Segundo Roche *et al.* (2009), o ECC e as mudanças na condição corporal podem ser usadas como medidas indiretas de gordura e balanço energético negativo (BEN).

Os resultados obtidos na presente pesquisa demonstram uma variação do escore de condição corporal nos diferentes momentos. No entanto, essas alterações se mantiveram dentro do esperado, pois no pré parto os animais apresentaram um ECC maior e após o parto ocorreu uma redução. Essa redução é explicada devido as diversas alterações que ocorrem nas vacas recém paridas, principalmente influenciadas pela redução de consumo alimentar (O'HARA *et al.* 2018). Portanto esse resultado demonstra que os animais estavam bem condicionados e tiveram um déficit de energia menos grave, que foi espelhado pela manutenção do ECC ideal no pós parto, como indicado por Buttchereit *et al.* (2012).

Durante a realização do experimento não houve mastite clínica em nenhum dos animais avaliados. Em relação a ocorrência de mastite subclínica, a mesma foi diagnosticada através do exame microbiológico pela técnica MALDI-ToF MS.

No MALDI-TOF, foi realizado o diagnóstico individual de cada quarto mamário. No entanto, trabalhamos com o diagnóstico positivo ou negativo, independente do número de quartos contaminados (Tabela 2).

Tabela 2 – Número e frequência de animais com diagnóstico positivo e negativo para a mastite subclínica.

	M2	M3	M4	M5
Positivo	21 (70,00%)	21 (70,00%)	17 (56,66%)	25 (83,33%)
Negativo	9 (30,00%)	8 (26,66%)	11 (36,66%)	4 (13,33%)
Não realizados	0	1 (3,33%)	2 (6,66%)	1 (3,33%)
Total	30	30	30	30

Legenda: M2 = momento 2 (dia do parto), M3= momento 3 (sete dias após o parto), M4= momento 4 (quinze dias após o parto), M5= momento 5 (trinta dias após o parto).

Apesar dos animais não apresentarem mastite clínica, as taxas de mastite subclínica foram altas, acima dos 56,66%. Esses resultados fecham uma lacuna citada por De Vlieghe *et al.* (2012), que em sua revisão sobre mastite citam que a maioria dos estudos não avaliam a ocorrência de mastite subclínica com a cultura microbiológica, usando apenas indicadores, como a contagem de células somáticas.

Dessa forma, a ausência do diagnóstico bacteriológico em pesquisas impede de conhecer resultados como a prevalência, incidência e efeitos da ocorrência de mastite subclínica de forma categórica (DE VLIEGHER *et al.* 2012).

De acordo com o *National Mastitis Concil* (2004), a mastite em novilhas é considerada um problema quando mais de 15% dos animais recém paridos apresentam a enfermidade. Nesse estudo, encontrou-se uma alta taxa de prevalência, sendo superior a 50% em todos os momentos avaliados.

Quando avaliamos a prevalência de mastite subclínica em cada quarto mamário de forma isolada, a grande maioria apresentou resultado negativo, sendo 309 amostras, representando 64,37% dos quartos.

Um ponto comum em todos os estudos sobre mastite subclínica em novilhas é a alta proporção de infecções causadas pelos *Staphylococcus* não *aureus* (SNA). Esses resultados concordam com a presente pesquisa, pois o patógeno mais encontrado foi o *Staphylococcus chromogenes*, em 60 amostras, correspondente a 12,5% dos quartos avaliados. Esse patógeno pertence ao grupo dos SNA (DOS SANTOS *et al.* 2016)

Outras pesquisas afirmam que *Staphylococcus aureus* foi o patógeno mais prevalente (DE VLIEGHER *et al.* 2012). Na presente pesquisa, \emptyset *S. aureus* foi segundo patógeno com maior ocorrência, presente em 31 amostras, representando 6,45% dos quartos acometidos.

Outros, como *Acinetobacter Iwoffii*, com 9 amostras positivas (1,87%), *Staphylococcus simulans* em 8 amostras (1,66%) e com 6 amostras positivas (1,25%) os patógenos *Acinetobacter sp* e *Corynebacterium bovis*.

Ainda, alguns patógenos foram encontrados em pequena quantidade, entre eles estão o *Streptococcus uberis*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter radioresistens*, *Acinetobacter schendleri*, *Acinetobacter townneri*, *Aerococcus viridans*, *Erwinia persicina*, *Escherichia vulneris*, *Pantoea sp.*, *Estreptococcus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Macroccoccus canis*, *Rothia endophytica*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warneri*.

Em relação aos parâmetros metabólicos (Tabela 3). Como referência, os valores estabelecidos por Kaneko *et al.* (2008) para a glicose foram de 45 a 75 mg/dL, 9,2 a 12,4 mg/dL para o cálcio, o valor de referência do fósforo foi de 5,6 a 6,5 mg/dL, colesterol de 80 a 120 mg/dL, triglicerídeos de 0 a 14 mg/dL, proteínas totais 6,7 a 7,5 g/dL, ureia de 20 a 30 mg/dL, creatinina de 1 a 2 mg/dL, GGT de 6,1 a 17,4 U/L, AST 78 a 132 U/L, ALT 11 a 40 U/L, fibrinogênio de 300 a 700 mg/dL, BHB até 1,1 mmol/L normal, de 1,1 até 3,5 cetose subclínica e acima de 3,5 mmol/L cetose clínica, já o valor de referência do AGNE para o M1 é até 0,4, nos M2, M3 e M4 até 0,8 e no M5 até 0,7 mmol/L.

Tabela 3 - Médias e desvio padrão (σ) dos resultados obtidos nos exames bioquímicos em diferentes momentos avaliativos.

	M1	M2	M3	M4	M5
Glicose	64,59 ^a ($\pm 9,04$)	63,41 ^a ($\pm 9,70$)	58,28 ^a ($\pm 9,44$)	60,59 ^a ($\pm 8,96$)	62,74 ^a ($\pm 7,53$)
Cálcio	10,83 ^a ($\pm 1,77$)	10,65 ^a ($\pm 1,69$)	10,85 ^a ($\pm 1,52$)	11,41 ^a ($\pm 1,71$)	11,75 ^a ($\pm 2,64$)
Fósforo	6,07 ^a ($\pm 0,94$)	5,62 ^b ($\pm 1,40$)	5,14 ^c ($\pm 1,03$)	5,39 ^d ($\pm 1,11$)	5,50 ^e ($\pm 1,32$)
Colesterol	74,22 ^a ($\pm 23,19$)	70,33 ^b ($\pm 25,42$)	81,10 ^c ($\pm 25,76$)	94,49 ^d ($\pm 20,58$)	115,14 ^c ($\pm 21,45$)
Triglicerídeos	19,22 ^a ($\pm 5,63$)	11,07 ^b ($\pm 3,20$)	10,69 ^c ($\pm 3,35$)	10,49 ^d ($\pm 3,35$)	7,68 ^e ($\pm 1,11$)
Proteínas	6,85 ^a ($\pm 0,69$)	6,37 ^b ($\pm 0,88$)	7,10 ^c ($\pm 0,98$)	7,33 ^d ($\pm 1,18$)	7,68 ^e ($\pm 1,11$)
Ureia	26,70 ^a ($\pm 12,76$)	29,26 ^a ($\pm 12,71$)	28,60 ^a ($\pm 10,97$)	28,03 ^a ($\pm 10,08$)	32,87 ^a ($\pm 11,32$)
Creatinina	1,29 ^a ($\pm 0,24$)	1,25 ^b ($\pm 0,26$)	1,16 ^c ($\pm 0,20$)	1,12 ^d ($\pm 0,17$)	1,14 ^e ($\pm 0,17$)
GGT	23,43 ^a ($\pm 6,72$)	24,03 ^a ($\pm 5,12$)	26,17 ^a ($\pm 6,96$)	26,89 ^a ($\pm 6,53$)	28,18 ^a ($\pm 14,00$)
AST	61,12 ^a 32,20	70,03 ^a 22,46	73,63 ^a 21,50	73,38 ^a 23,40	69,66 ^a 16,74
ALT	12,18 ^a ($\pm 4,18$)	12,99 ^b ($\pm 4,00$)	13,02 ^c ($\pm 3,61$)	13,04 ^d ($\pm 3,14$)	15,59 ^e ($\pm 4,43$)
AGNE	0,21 ^a ($\pm 0,21$)	0,55 ^b ($\pm 0,38$)	0,57 ^c ($\pm 0,34$)	0,57 ^d ($\pm 0,38$)	0,36 ^e ($\pm 0,22$)
BHB	0,50 ^a ($\pm 0,16$)	0,59 ^b ($\pm 1,29$)	0,91 ^c ($\pm 1,87$)	0,79 ^d ($\pm 0,63$)	0,60 ^e ($\pm 0,33$)

Legenda: M1 = momento 1 (quinze dias antes do parto), M2 = momento 2 (dia do parto), M3= momento 3 (sete dias após o parto), M4= momento 4 (quinze dias após o parto), M5= momento 5 (trinta dias após o parto). *Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre as médias dos momentos ($P \leq 0,05$).

Como observado, nos exames de Glicose, Cálcio, Ureia e AST, não houve diferença significativa entre os momentos avaliativos. Enquanto que nas concentrações séricas de fósforo, colesterol, proteínas totais, creatinina, GGT, ALT, AGNE e BHB houve diferença significativa entre os momentos avaliativos.

Na Tabela 4 pode-se observar o número de animais com resultados abaixo do valor de referência, resultados dentro do esperado, acima e exames não realizados.

Tabela 4 – Número de animais que apresentaram em seus exames resultados abaixo do valor de referência, resultados dentro do esperado, acima e exames não realizados.

	M1	M2	M3	M4	M5
--	----	----	----	----	----

	ab	n	ac	nr	ab	n	ac	nr	ab	n	ac	nr	ab	n	ac	nr	ab	N	ac	nr
GLI	1	26	3	0	0	26	4	0	3	26	0	1	0	27	1	2	0	28	1	1
CAL	6	20	4	0	8	19	3	0	3	24	2	1	2	19	7	2	3	16	10	1
FOS	8	14	8	0	15	10	5	0	20	7	2	1	14	11	3	2	16	9	4	1
COL	19	11	0	0	20	8	2	0	14	14	1	1	6	19	3	2	0	18	11	1
TRI	0	5	25	0	0	23	7	0	0	24	5	1	0	23	5	2	0	24	5	1
PTN	5	21	4	0	17	12	1	0	6	17	6	1	7	15	6	2	3	9	17	1
URE	8	14	5	0	7	12	11	0	4	16	9	1	5	15	8	2	1	14	14	1
CRE	1	28	1	0	2	27	1	0	4	25	0	1	4	24	0	2	5	24	0	1
GGT	0	3	27	0	0	3	27	0	0	3	26	1	0	1	27	2	0	2	27	1
AST	28	1	1	0	23	6	1	0	20	9	0	1	22	5	1	2	23	6	9	1
ALT	13	17	9	0	14	16	0	0	10	19	0	1	8	19	0	2	3	26	0	1
AGN	0	27	3	0	0	24	6	0	0	22	7	1	0	22	6	2	0	26	3	1
BHB	0	30	0	0	0	28	2	0	0	26	3	1	0	25	3	2	0	28	1	1

Legenda: M1 = momento 1 (quinze dias antes do parto), M2 = momento 2 (dia do parto), M3= momento 3 (sete dias após o parto), M4= momento 4 (quinze dias após o parto), M5= momento 5 (trinta dias após o parto). GLI (glicose), CAL (cálcio), FOS (fósforo), COL (colesterol), TRI (triglicerídeos), PTN (proteínas totais), URE (ureia), CRE (creatinina), GGT (gama glutamil transferase), AST (aspartato amino transferase), ALT (alanina amino transferase), AGN (ácidos graxos não esterificados), BHB (beta hidroxibutirato), ab (abaixo do valor de referência), n (dentro do valor de referência), ac (acima do valor de referência) e nr (não realizado).

Os resultados nos mostram que a glicose, cálcio, proteínas totais, creatinina, ácidos graxos não esterificados e beta hidroxibutirato mantiveram-se na grande maioria, seus resultados dentro do valor esperado. O fósforo teve variações maiores, sendo que a maioria dos animais permaneceu abaixo dos valores recomendados para bovinos em todos os momentos.

Os níveis abaixo do normal de fósforo ocorreram após o parto, sendo que no M2 metade dos animais (50%) apresentaram hipofosfatemia, no M3 66,66%, no M4 46,66% e no M5 53,33%. De acordo com Kaneko *et al.* (2008) a fosfatemia normal é entre 5,6 a 6,5 mg/dL e possui uma relação inversa com o cálcio. Ou seja, quando um aumenta o outro diminui.

Uma possível explicação para essa diminuição dos níveis de fósforo é que esse mineral é responsável pelo crescimento fetal. No final da gestação, a fêmea perde cerca de 10 g de fósforo/dia. Com o início da lactação, estima-se que ocorra a perda de 1 g de fósforo para cada litro de leite produzido (GOFF, 2018), explicando então as baixas concentrações encontradas nesse estudo no pré e pós parto.

Em relação ao cálcio, na maioria dos animais o cálcio se manteve dentro dos limites esperados. Sendo que em pelo menos 60% dos animais, os níveis de cálcio estavam normais em todos os momentos. Para que essa condição de normocalcemia seja mantida pelos animais, é importante um bom ajuste na dieta pré parto. Além disso, as vacas conseguem mobilizar cálcio absorvendo via intestinal e até mesmo fazem a mobilização através da reabsorção da reserva óssea (CUNNINGHAM, 2020; NEDIC *et al.* 2020).

Assim como o cálcio, a glicose manteve os níveis esperados em pelo menos 85% dos animais em todos os momentos avaliados. Isso nos indica um equilíbrio metabólico nas novilhas do presente estudo. Esse resultado é importante, visto que existem consequências negativas quando há um desequilíbrio na concentração de glicose, principalmente relacionado a baixas concentrações, resultando em hipoglicemia e aumento na ocorrência de doenças (ROBERTS *et al.* 2012).

A glicose é considerada a principal fonte de energia por todas as espécies de animais (CAÑIZARES, RODRIGUES e CAÑIZARES, 2009). No pós parto, seu requerimento é alto, principalmente pela glândula mamária para a produção de leite.

No pós parto é normal que ocorra uma queda no consumo de matéria seca pelos animais recém paridos, aliada a demanda energética aumentada. Como consequência as reservas corporais de gordura começam a serem mobilizadas, aumentando as taxas de gliconeogênese para suprir a necessidade alta de glicose. No entanto, a glicose é impedida de ser utilizada, devido à resistência ao hormônio do crescimento perante à insulina. Como resultado, há um estímulo para a quebra ainda maior de gordura (lipólise), resultando na mobilização de AGNEs que passam a serem usados como fonte de energia (DRACKLEY, 1999). No entanto, na presente pesquisa essa cascata de alterações metabólicas não foi identificada nos animais.

Uma consequência da intensa mobilização de AGNEs é o aumento de BHB. No entanto, como não houve alterações drásticas nos níveis de glicose, os níveis de AGNE também se mantiveram dentro do esperado juntamente com os níveis de BHB. Isso indica que os animais tiveram um excelente manejo alimentar no periparto, que foi refletido pelos bons resultados dos exames realizados.

Em relação aos AGNEs, o nível de normalidade foi verificado em pelo menos 73% dos animais, enquanto que o BHB se manteve normal em pelo menos 83% dos animais nos diferentes momentos avaliados.

Outro metabólito importante é o colesterol. Sua diminuição no periparto também é um importante indicador do metabolismo energético. Nesse caso, os níveis de colesterol se mantiveram abaixo do esperado, visto que há um aumento da captação desse composto para a produção de leite (BIONAZ, PÉREZ e BUSATO, 2020), fato que foi evidenciado no presente estudo.

Um resultado que merece destaque é o fato dos 25 animais (83,33%) terem apresentado resultados acima do valor esperado no M1 no exame de triglicerídeos. A formação de triglicerídeos ocorre devido ao excesso de oxidação de AGNEs (SORDILLO e RAPHAEL, 2013). No entanto, no M1 os animais não apresentaram valores acima do esperado nos AGNEs.

Alguns exames, como por exemplo o de Gama Glutamil Transferase (GGT), se manteve com resultados acima dos valores recomendados, em praticamente todos os animais, nos cinco momentos avaliativos. A AST se manteve abaixo do esperado em quase todos os animais nos diferentes momentos. Já na ALT grande parte dos animais teve seus resultados abaixo dos valores esperados em todos os momentos. GGT, AST e ALT são enzimas utilizadas para avaliar função hepática.

Naturalmente a GGT tem valores maiores nos bovinos. Essas alterações nas enzimas que avaliam a função hepática, podem ser justificadas devido as diversas alterações ocasionadas pelo BEN, alterações que muitas vezes ocorrem de forma brusca. Além disso, o BEN desencadeia a lipólise que pode provocar lesões hepáticas devido à infiltração gordurosa (OLIVEIRA *et al.* 2014).

As alterações metabólicas mais intensas e efeitos do balanço energético negativo são mais descritas em vacas múltiparas (GONZALEZ *et al.* 2009; ROBERTS *et al.* 2012; OLIVEIRA *et al.* 2014; DEBSKI *et al.* 2017). No presente estudo, as novilhas avaliadas eram muito bem manejadas nutricionalmente, com profissionais capacitados para isso. Fato que pode ter influenciado para poucas alterações evidentes.

Conclusão

As alterações metabólicas do presente estudo ocorreram de forma isolada, em poucos animais e dessa forma não influenciaram na ocorrência de mastite. Houveram algumas alterações em casos isolados, mas de maneira geral os animais apresentaram resultados dentro dos parâmetros normais nos diferentes exames. Um manejo nutricional

adequado, aliado a um bom manejo de ordenha se tornam essenciais para diminuição das taxas de doenças no periparto, principalmente a mastite.

Referências

ARCANJO, A. H. M. *et al.* The program has two controls to control the flow of light. **Global Science and Technology**, v. 10, n. 1, 2017.

BARREIRO, J. R. *et al.* Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 12, p. 5661-5667, 2010.

BARREIRO, J. R. *et al.* Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 4, p. 2928-2934, 2017.

BERGE, A. C.; VERTENTEN, G. A field study to determine the prevalence, dairy herd management systems, and fresh cow clinical conditions associated with ketosis in western European dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.97, p. 2145-54, 2014.

BIONAZ, M., VARGAS-BELLO-PÉREZ, E. e BUSATO, S. Advances in fatty acids nutrition in dairy cows: from gut to cells and effects on performance. **Journal Animal Science and Biotechnology**, v. 11, p. 110, 2020.

BIRGEL, E. H. Semiologia da glândula mamária de ruminantes. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Editora Roca, 2014. 1406 p.

BUTTCHEREIT, N. *et al.* Genetic parameters for energy balance, fat/protein ratio, body condition score and disease traits in German Holstein cows. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 129, n. 4, p. 280-288, 2012.

CAÑIZARES, G. I. L.; RODRIGUES, L.; CAÑIZARES, M. C. Metabolism of non-structural carbohydrates in ruminants. **Archives of veterinary Science**, v. 14, n. 1, 2009.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**, 5ª Edição, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2020, 1966p.

DEBSKI, B. *et al.* Effect of Pregnancy and Stage of Lactation on Energy Processes in Isolated Blood Cells of Dairy Cows. **Journal Veterinary Reserch**, v. 61, n.2, p. 211-215, 2017.

DE VLIEGHER, S. *et al.* Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal Dairy Science**, v.95, n.3 p.1025-1040, 2012.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 9, p. 2259- 2273, 1999.

DONADEU, F. X. *et al.* Farmer and veterinary practices and opinions related to the diagnosis of mastitis and metabolic disease in UK dairy cows. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, p. 127, 2020.

- DOS SANTOS, D. C. *et al.* “*Staphylococcus chromogenes*, a Coagulase-Negative *Staphylococcus* Species That Can Clot Plasma” **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n.5, p.1372-1375, 2016.
- EDMONSON, A. J. *et al.* A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 72, n. 1, p. 68-78, 1989.
- FERREIRA, G. A. *et al.* Estratégias de prevenção da mastite bovina no período de transição. **Veterinária em Foco**, v. 12, n. 2, 2015.
- FOX, L. K. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. **Veterinary microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 82-88, 2009.
- GOFF, J. P. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect 2 acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2763–2813, 2018.
- GONZÁLEZ, F. *et al.* 2009. Indicadores sanguíneos de lipomobilização e função hepática no início da lactação em vacas leiteiras de alta produção. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, p. 64- 69, 2009.
- HARMON, R. *et al.* **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infections**. 3. ed. Arlington: VA, National Mastitis Council, 1990. 34 p.
- HEUER, C.; SCHUKKEN, Y. H.; DOBBELAAR, P. Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 295-304, 1999.
- FUKUSHIMA, Y. *et al.* Epidemiological study to investigate the incidence and prevalence of clinical mastitis, peracute mastitis, metabolic disorders and peripartum disorders, on a dairy farm in a temperate zone in Japan. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2020.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 8^a ed. San Diego: Academic Press, 2008. 916p.
- MIKUŁA, Ret al. Changes in metabolic and hormonal profiles during transition period in dairy cattle—the role of spexin. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2021.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Heifer Mastitis Prevention and Control Plan**, n. 605, New Prague, Minnesota, USA, 2004.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4. ed. Verona: NMC, 2004. 47 p.
- NEDIC, S. *et al.* Parathyroid hormone response in treatment of subclinical hypocalcemia in postpartum dairy cows. **Reserch Veterinary Science**, v. 132, p. 351-356, 2020.

O'HARA, E. *et al.* Effects of dry period length on milk production and energy balance in two cow breeds. **Animal**, v. 12, n. 3, p. 508-514, 2018.

OLIVEIRA, R. S. B. R. *et al.* Perfil metabólico de vacas mestiças leiteiras com baixo escore de condição corporal no periparto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 362-368, 2014.

ROBERTS, T. *et al.* Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 6, p. 3057-3063, 2012.

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.

SORDILLO, L. M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity¹. **Journal of Dairy Science**, v.99, p. 4967–82, 2016.

SORDILLO, L. M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 267-278, 2013.

4. ARTIGO 3

Artigo confeccionado conforme as normas do periódico “Revista Agrária Acadêmica (Anexo1)”.

IMPACTO DA EXPRESSÃO DE PD-1 E CTLA-4 EM LINFÓCITOS NA SUSCEPTIBILIDADE E OCORRÊNCIA DE MASTITE DURANTE O PERÍODO PÓS-PARTO EM VACAS PRÍMIPARAS

Luana Carolina Bachmann Gregolin*¹, Maiara Garcia Blagitz², Marta Lizandra do Rêgo Leal³

^{1*} Mestranda no programa de Pós-graduação Saúde, Bem estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul – Universidade Federal da Fronteira Sul-UFFS, REALEZA/PR – BRASIL. E-mail: lubgregolin@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4135-1515

² Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – Realeza/PR – BRASIL.

³ Docente do Departamento de Clínica de Grandes Animais da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, SANTA MARIA/RS – BRASIL.

Resumo

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a possível influência do PD-1 e CTLA-4 na susceptibilidade e ocorrência de mastite no pós-parto em novilhas. Foram examinadas trinta novilhas da raça Holandesa, provenientes de duas fazendas leiteiras. Os animais foram avaliados em cinco momentos distintos, que foram quinze dias antes do parto (M1), no dia do parto (M2), sete dias (M3), quinze (M4) e trinta dias após o parto (M5). No M1 houve a avaliação imunológica e apenas sangue foi coletado. A partir do M2 leite e sangue foram coletados para avaliação hematológica e avaliação da ocorrência de mastite. No M1, o sangue coletado foi preparado e a separação das células mononucleares do sangue periférico foi realizada (PBMC). Através do PBMC, foi realizada a imunofenotipagem pela citometria de fluxo com anticorpos específicos. A glândula mamária foi avaliada de forma minuciosa, incluindo avaliação de sujidade. Exames como o teste da caneca do fundo preto, *California Mastitis Test* (CMT), contagem de células somáticas microscópica diferencial (CCSMD) e MALDI-ToF MS foram realizados. Não houve ocorrência de mastite clínica durante o experimento. Foram isolados 25 patógenos diferentes em 64,37% dos quartos mamários avaliados. No que diz respeito aos resultados imunológicos, foi possível observar que existe uma influência da PD-1 e CTLA-4 na ocorrência de mastite. Com isso, pode-se perceber que quanto maior a expressão de ambos no período que antecede o parto, maior foi a ocorrência de mastite subclínica no pós parto.

Palavras chave: Periparto. Linfócitos T. Pontos de controle imunológico. Receptores inibitórios.

Regulação positiva.

Abstract

The objective of this research was to evaluate the possible influence of PD-1 and CTLA-4 on susceptibility and occurrence of postpartum mastitis in heifers. Thirty Holstein heifers from two dairy farms were examined. The animals were evaluated in five different moments, which were fifteen days before parturition (M1), on the day of parturition (M2), seven days (M3), fifteen (M4) and thirty days after parturition (M5). At M1 there was immunological evaluation and only blood was collected. From M2 on, milk and blood were collected for hematological evaluation and evaluation of the occurrence of mastitis. At

M1, the collected blood was prepared and separation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was performed. Using the PBMC, immunophenotyping was performed using flow cytometry with specific antibodies. The mammary gland was thoroughly evaluated, including assessment of soiling. Examinations such as the black bottom mug test, California Mastitis Test (CMT), differential microscopic somatic cell count (DMSC) and MALDI-ToF MS were performed. There was no occurrence of clinical mastitis during the experiment. Twenty-five different pathogens were isolated in 64.37% of the breast quarters evaluated. Regarding the immunological results, it was possible to observe that there is an influence of PD-1 and CTLA-4 on the occurrence of mastitis. With this, it was possible to notice that the higher the expression of both in the period before parturition, the higher was the occurrence of subclinical mastitis in the post parturition period.

Key words: Peripartum. Lymphocytes T. Immunological checkpoints. Inhibitory receptors. Positive regulation.

Introdução

A mastite é uma das doenças mais comuns e prejudiciais que as fêmeas bovinas podem apresentar (JAMALI *et al.* 2020), podendo acometer os animais desde a sua primeira lactação. Em novilhas o impacto é muito maior, pois a produção leiteira pode ser comprometida na atual e nas próximas lactações (HUIJPS, LAM e HOGVEEN, 2008) resultando em perdas consideráveis.

Essa enfermidade afeta diretamente o bem-estar do animal acometido e também ocasiona um impacto econômico negativo aos produtores ((DE VLIEGHER *et al.* 2012), além de afetar a quantidade e qualidade do leite produzido (ZIGO *et al.* 2021). Os valores desembolsados com a mastite são justificados pelo descarte do leite, redução na produção a curto e longo prazo, custo alto e trabalho adicional com as medicações, descarte prematuro dos animais, além do risco de resíduos antibióticos no leite (HUIJPS *et al.* 2009).

O uso indiscriminado de antimicrobianos é uma grande preocupação mundial. O emprego de antimicrobianos em rebanhos leiteiros está frequentemente relacionado com a saúde do úbere, visto que a maioria dos medicamentos são utilizados para o tratamento e controle de mastite (SVILAND e WAAGE, 2002; RUEGG, 2017). Como alternativa ao uso de antimicrobianos, torna-se urgente a introdução de alternativas à prevenção de mastite (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). É notório que no

período em torno do parto ocorre uma imunossupressão que facilita o aparecimento de doenças infecciosas (ALERI *et al.* 2019). Esse período traz uma preocupação ainda maior em novilhas, visto que a incidência de mastite nessa categoria é maior nos primeiros dias pós-parto do que em vacas multíparas (MCDOUGALL *et al.* 2007)

Quando há um desafio, os LT, que tem características efetoras importantes, acabam perdendo essas particularidades prejudicando a resposta imune. Esse prejuízo colabora para a ativação de receptores inibitórios, fornecendo sinais inibitórios aos LT (CHO *et al.* 2017) e induzindo a exaustão imune. Alguns exemplos são a proteína de morte programada 1 (PD-1) e a proteína 4 associada ao LT citotóxico (CTLA-4) (WHERRY, 2011; HOSSEINI *et al.* 2020). Ambas proteínas pertencem aos receptores da família CD28, que são moléculas co-estimuladoras, que fornecem sinais inibitórios aos LT (CHEN *et al.* 2021).

O PD-1 pode ser expresso em diferentes células imunes, como os linfócitos B e T ativados, monócitos, células NK e vários linfócitos de tumores infiltrativos (DOLAN, GUPTA, 2014).

Diversos estudos vêm sendo realizados nessa promissora área médica, principalmente a respeito da importância e uso desses pontos de controle imunológicos (*checkpoints*) na terapia autoimune, tratamentos oncológicos e de doenças crônicas (CHO *et al.* 2017; CHEN *et al.* 2021; YU *et al.* 2021).

Em infecções da glândula mamária, como é o caso da mastite, não há nenhum estudo disponível na literatura, principalmente em relação a função da PD-1 e CTLA-4 nos LT. Portanto, espera-se com o presente estudo avaliar a possível influência do PD-1 e CTLA-4 na susceptibilidade e ocorrência de mastite no pós-parto em novilhas, além de abrir caminhos para uma nova terapia por meio da regulação das respostas imunológicas.

Materiais e métodos

Comitê de Ética em Pesquisa.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS (nº 8290280720, 5403300919, 6321041021).

Animais utilizados, manejo nutricional e instalações

O estudo foi realizado de outubro de 2020 a julho de 2021 em duas fazendas leiteiras localizadas no município de Salto do Lontra (PR). Ambas em sistema de produção confinado, uma manejada no sistema *Compost Barn* (F1) e a outra *Free Stall* (F2).

A propriedade mantida em sistema *Compost Barn* contava com 120 animais em lactação e a média diária de produção leiteira era de 39 litros por vaca. A propriedade do sistema *Free Stall* contava com 80 animais em lactação e a média diária leiteira era de 35 litros por vaca.

Ambas as propriedades adotavam manejo alimentar semelhante. No período entre 60 e 30 dias antes do parto, os animais se alimentavam de silagem de milho, pré-secado de aveia, ração comercial, farelo de soja e mineral comercial. Ainda no período pré-parto, aproximadamente 30 dias antes do parto, os animais passavam a se alimentar com silagem de milho, feno e ração, preparada na propriedade, composta por farelo de soja, casquinha de soja, mineral pré-parto (Milk Sacc[®], Alltech, Kentucky, EUA).

Foram pré-selecionados animais hípidos e sem histórico recente de enfermidades. Os animais estavam com o peso e altura ideal indicado para o periparto. A raça holandesa era predominante nos rebanhos e todos os animais avaliados foram novilhas holandesas preta e branca.

Momentos de avaliação e coleta de amostras de sangue

Para as avaliações foram utilizadas 30 novilhas em fase de periparto, destas 20 novilhas eram da F1 e 10 da F2. As coletas de sangue foram realizadas em datas específicas, a primeira foi aproximadamente 21 dias antes do parto (Momento 1 – M1). Na sequência, após a parição dos animais, as amostras foram colhidas no dia do parto (Momento 2 – M2), sete dias após o parto (Momento 3 – M3), 15 dias após o parto (Momento 4 – M4) e 30 dias após o parto (Momento 5 – M5).

O sangue foi coletado por punção a veia coccígea usando o sistema vacutainer[®] (BD, New Jersey, EUA) por meio de agulhas 25x10 e tubos plásticos com EDTA e com capacidade de 5 mL para o hemograma. Tubos plásticos com anticoagulante heparina também foram utilizados e destinados à avaliação imunológica. Os tubos com material sanguíneo foram acondicionados em caixas isotérmicas, na temperatura de 4 °C e encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas da Superintendência Unidade

Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU) da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*.

Os animais passaram por um exame físico detalhado em todos os momentos, com intuito de verificar e diagnosticar alguma possível enfermidade que viesse a ocorrer. O exame prosseguiu como sugerido por Feitosa (2014). Parâmetros como a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), movimentos ruminais (MRUM), avaliação das mucosas, aferição da temperatura corpórea e tempo de preenchimento capilar foram mensurados por um único examinador em todos os momentos do estudo. Ademais, em todos os momentos o escore de condição corporal foi avaliado conforme os critérios descritos por Edmonson *et al.* (1989), em uma escala de 1 a 5 (EDMONSON *et al.* 1989).

Momentos de avaliação e coleta de amostras de leite

As coletas de leite foram realizadas a partir do M2. Para a coleta de leite, os animais foram conduzidos até a sala de espera, durante a rotina de ordenha de cada propriedade, e após entrarem na sala de ordenha foi iniciado o procedimento para a coleta. Inicialmente a glândula mamária foi observada com intuito de identificar alguma alteração. Posteriormente os quartos foram higienizados com solução pré-*dipping*, seguido pelo teste da caneca de fundo escuro. Para este teste, os três primeiros jatos de leite foram descartados e avaliados conforme os critérios estabelecidos por Birgel (2014), observando a cor, consistência e presença de massas ou grumos da secreção. Novamente os quartos foram emergidos em solução pré-*dipping* e após trinta segundos foram secos com toalha de papel individualmente.

As amostras de leite foram colhidas em três alíquotas por quarto. Uma foi destinada para o exame microbiológico, outra para exame de contagem de células somáticas microscópica diferencial (CCSMD) e a última para realização do *Califórnia Mastitis Test* (CMT).

As amostras de leite para o exame microbiológico foram colhidas assepticamente conforme as recomendações de Harmon *et al.* (1990) e do *National Mastitis Council*, (2004) em dois tubos plásticos estéreis, previamente identificados, com capacidade de 5 mL. Após a coleta as amostras foram alocadas em caixas isotérmicas, com temperatura controlada de 4°C até a chegada no laboratório e armazenadas em freezer com temperatura de -20°C até a realização do exame microbiológico e identificação bacteriana pela técnica MALDI-ToF MS, conforme as recomendações de Barreiro *et al.* (2010 e

2017).

Para a CCSMD foi utilizado um tubo falcon previamente identificado com capacidade de 50 mL, dos quais 25 mL já estavam preenchidos com solução tampão fosfato-salino (PBS) (DELLA LIBERA *et al.* 2004). O leite destinado ao CMT foi coletado em tubo falcon identificado e com capacidade de 15 mL. Todas as amostras de leite coletadas foram acondicionadas em caixa isotérmicas, com temperatura controlada de 4°C e encaminhadas ao laboratório.

O leite coletado para realização do exame *Califórnia Mastitis Test* (CMT) foi encaminhado imediatamente para uma sala anexa à sala de ordenha onde o mesmo foi realizado. Foram utilizados 2 mL de cada quarto mamário e dois mL do reagente CMT em cada poço da raquete, em seguida foi homogeneizado através de movimentos circulares e o grau de viscosidade foi observado. As alterações foram pontuadas conforme Schalm e Noorlander (1957), observando a intensidade da reação, onde o zero (0), representou a negatividade da formação de gel no teste; traços, quando houve um leve espessamento, mas sem formação de gel; 1 cruz, na qual a positividade era fraca, mas com espessamento imediato e leve formação de gel; 2 cruces, houve a formação de gel forte e 3 cruces foi quando a formação de gel foi muito forte.

Acompanhamento e avaliação da incidência de mastite clínica na propriedade

Durante o período do estudo, em todas as ordenhas, foi realizado pelo responsável em realizar a ordenha na propriedade o exame de fundo escuro. Toda e qualquer alteração no leite, como mudança na coloração, consistência e presença de massas ou grumos foi registrada em uma planilha fornecida pelos pesquisadores.

Avaliação da sujidade da glândula mamária

Foi utilizado um critério visual realizado após os animais entrarem na sala de ordenha e antes da coleta de leite. Realizou-se essa avaliação de acordo com os critérios estabelecidos por Schreiner e Ruegg (2003). Os seguintes escores foram avaliados: Escore 1 (E1) foi quando a glândula mamária estava livre de sujidade, Escore 2 (E2) quando de 2 a 10% da glândula estavam comprometidas com sujidade, Escore 3 (E3) foi considerado quando de 10 a 30% da glândula estavam sujos e Escore 4 (E4) quando mais que 30% da glândula mamária apresentavam sujidade.

Mensuração da produção

No M4, os animais foram submetidos a medição do leite produzido. Os dados foram anotados nas três ordenhas diárias da F1 e nas duas ordenhas da F2.

Laboratório

Hemograma

No laboratório o número total de leucócitos foi mensurado através da contagem automática (ABC Vet[®] - ABXTM). A contagem diferencial foi realizada por esfregaços sanguíneos corados pelo método Panótico (Laborclin[®], Brasil), para a diferenciação do padrão leucocitário ao microscópio óptico com aumento de 1000 X. Foi realizada a avaliação do hematócrito e dosadas as proteínas totais plasmáticas e fibrinogênio. A dosagem tanto da proteína total plasmática quanto do fibrinogênio foram realizados através refratômetro.

Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

As amostras de sangue colhidas no M1 foram processadas e armazenadas no Laboratório de Análises Clínicas da SUHVU da UFFS – *Campus Realeza* e posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e submetidas a imunofenotipagem.

Para isto, estas foram preparadas de acordo com Della Libera *et al.* (2012). As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas em Ficoll-Paque[™] Plus[®] (GEHealthcare, EUA, n.º. cat. 17-1440-03), preservadas de acordo com as recomendações do fabricante e armazenadas em dois eppendorfs em freezer -80 °C.

Imunofenotipagem

A identificação e a intensidade da expressão de PD-1 e CTLA – 4 foram realizadas por citometria de fluxo com anticorpos.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) que estavam em tubos do tipo eppendorfs foram descongeladas em banho Maria utilizando tubo falcon com álcool a 37° C. Após o descongelamento foram transferidas para um tubo falcon de 15 mL onde foram adicionados 5 mL de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Dutch Modification - R 7638) + 10% de soro fetal bovino (SFB). Após isso foram preparados os tubos com os anticorpos.

Foram utilizados tubos próprios para citometria, produzidos em polipropileno, com capacidade de 5 mL, fundo redondo, 12 x 75mm. Primeiramente foi realizada a preparação dos tubos de calibração e dos tubos do experimento, onde cada um foi devidamente identificado. Na primeira etapa apenas os anticorpos primários foram colocados e incubados em temperatura ambiente por 30 minutos.

Após os 30 minutos de incubação, houve a preparação para os anticorpos secundários serem adicionados. Para isso, as células foram lavadas com PBS 10x, centrifugadas a 250 g a 4°C durante 8 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ressuspensionado em 1 mL de RPMI e após isso os anticorpos secundários foram anexados.

Foram utilizados cinco tubos por animal, destes três foram para calibração do equipamento que foram o Tubo A- Tubo branco, Tubo B - PBMC + PD1 (LSBio – LS – C55247) + Alexa Fluor 488 (Invitrogen – A11055), Tubo C - PBMC + CTLA - 4 (R&D Systems – AF386 – PB) + Alexa Fluor 488 (Invitrogen – A11055) e dois do experimento, Tubo D - PBMC + PD1 + Alexa Fluor??? e Tubo E - PBMC + CTLA - 4 + Alexa Fluor.

As amostras foram novamente incubadas conforme a indicação do fabricante de cada anticorpo em temperatura ambiente. Posteriormente 1 mL de PBS foi adicionado e os tubos foram novamente centrifugados a 250 g por 8 minutos à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e para finalizar foi acrescentado SFB e paraformol para fixar as células, seguida da leitura no citômetro.

Vinte mil eventos de cada amostra foram analisados e os linfócitos identificados quanto às suas características de *Forward Scatter* (FSC), *Side Scatter* (SSC) e fluorescência utilizando-se do programa CELLQUEST® (Becton Dickinson Immunocytometry Systems™). Posteriormente os resultados foram analisados pelo Flow Jo Tree Star® (FlowJo - Treestar 10.5.3 para Windows, Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

Contagem de células somáticas

O exame de contagem de células somáticas microscópica diferencial (CCSMD) foi realizado conforme descrito por Della Libera *et al.* (2004). As amostras foram centrifugadas a 450 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. O botão celular foi desprezado utilizando 50mL de PBS e repetindo a centrifugação. Após desprezar o sobrenadante, 1mL de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) ressuspendeu a amostra. Para a citocentrifugação, lâminas juntamente com filtros apropriados foram encaixados na base da caçapa própria para citocentrífuga e então pipetados 200 µL da amostra no orifício da caçapa e centrifugada a 28 x g por 6 minutos. As lâminas resultantes do sedimento lácteo foram fixadas com Metanol P.A. por 10 minutos e coradas pela coloração Panótico (Laborclin®, Brasil). Foram contadas 100 células em microscópio óptico em aumento de 1000 x observando os diferentes tipos celulares, diferenciando em neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos.

MALDI-ToF MS

As amostras de leite foram encaminhadas ao laboratório Qualileite da Universidade de São Paulo, onde a identificação dos possíveis agentes causadores de mastite subclínica foi pela técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa seguindo as recomendações de Barreiro *et al.* (2010 e 2017).

Análise Estatística

Todos os dados foram digitados em uma base de dados e verificados duas vezes para erros de entrada. Análise descritiva de dados incluiu a computação de mediana, com intervalo interquartil e para populações de células individuais e frequência de variáveis do tipo categórico. Os dados foram descritos usando técnicas descritivas e gráficas. Análise foi realizada utilizando o programa de software SAS 9.4 (SAS Institute).

Vários modelos logísticos multivariáveis foram usados para avaliar a relação entre diferentes populações de células e distribuição binária para a variável resultado (presença de mastite, sim ou não).

Resultados e discussões

Os animais do estudo tiveram seu estado de saúde geral avaliado. Um exame clínico detalhado foi realizado individualmente em cada animal, bem como uma avaliação hematológica em todos os momentos estudados. Houve diferença no escore de condição corporal nos diferentes momentos. Além disso, a temperatura corporal também apresentou variação. Parâmetros como a frequência cardíaca, frequência respiratória e movimentos ruminais não apresentaram diferença entre os momentos avaliativos. Os resultados do exame clínico geral e hemograma estão dispostos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Médias e desvio padrão (σ) dos parâmetros vitais avaliados nos diferentes momentos.

	M1	M2	M3	M4	M5
ECC	3,1 ^a ($\pm 0,5$)	2,7 ^b ($\pm 0,4$)	2,5 ^c ($\pm 0,3$)	2,4 ^d ($\pm 0,2$)	2,5 ^e ($\pm 0,1$)
FC	85,0 ^a ($\pm 10,0$)	86,0 ^a ($\pm 13,0$)	82,0 ^a ($\pm 10,0$)	83,0 ^a ($\pm 10,0$)	80,0 ^a ($\pm 9,0$)
FR	44,0 ^a ($\pm 12,0$)	44,0 ^a ($\pm 13,0$)	46,0 ^a ($\pm 16,0$)	42,0 ^a ($\pm 9,0$)	40,0 ^a ($\pm 9,0$)
MRUM	2,2 ^a ($\pm 0,5$)	2,1 ^a ($\pm 0,5$)	1,9 ^a ($\pm 0,7$)	2,0 ^a ($\pm 0,6$)	2,2 ^a ($\pm 0,4$)
TEMP °C	38,3 ^a ($\pm 0,6$)	38,7 ^b ($\pm 0,5$)	38,9 ^c ($\pm 0,5$)	38,5 ^d ($\pm 0,4$)	38,5 ^e ($\pm 0,6$)

Legenda: M1 = momento 1 (quinze dias antes do parto), M2 = momento 2 (dia do parto), M3= momento 3 (sete dias após o parto), M4= momento 4 (quinze dias após o parto), M5= momento 5 (trinta dias após o parto). ECC: escore de condição corporal, FC: frequência cardíaca, FR: frequência respiratória, MRUM: movimentos ruminais em dois minutos, TEMP: temperatura retal. *Letras diferentes na mesma linha representam diferença entre as médias ($P \leq 0,05$).

Tabela 2 – Médias e desvio padrão (σ) dos resultados obtidos no hemograma nos diferentes momentos avaliativos.

	M1	M2	M3	M4	M5
LEU	9,76 ^a (±5,52)	12,66 ^a (±6,11)	10,45 ^a (±5,04)	9,11 ^a (±3,83)	9,23 ^a (±4,65)
PTN	6,94 ^a (±0,60)	6,75 ^b (±0,83)	7,09 ^c (±0,63)	7,57 ^d (±0,61)	7,87 ^e (±0,61)
HT	27,02 ^a (±3,35)	28,58 ^b (±3,55)	25,98 ^c (±2,69)	25,98 ^d (±3,44)	25,71 ^e (±2,98)
HEM	5,92 ^a (±1,13)	6,37 ^a (±0,93)	5,89 ^a (±0,71)	5,68 ^a (±0,97)	6,19 ^a (±0,96)
HB	7,89 ^a (±0,89)	8,21 ^b (±0,96)	7,55 ^c (±0,73)	7,20 ^d (±0,93)	7,59 ^e (±0,87)
VCM	45,55 ^a (±3,94)	45,26 ^b (±4,23)	45,62 ^c (±3,25)	44,34 ^d (±3,97)	44,45 ^e (±3,68)
CHCM	29,21 ^a (±2,42)	28,74 ^a (±1,87)	29,09 ^a (±2,38)	29,59 ^a (±2,67)	29,54 ^a (±1,32)
RDW	19,80 ^a (2,62)	19,80 ^a (3,41)	19,29 ^a (1,41)	19,22 ^a (1,51)	19,38 ^a (1,08)
PLA	177,00 ^a (±66,00)	181,00 ^a (±59,00)	206,00 ^a (±64,00)	226,00 ^a (±91,00)	212,00 ^a (±102,00)
HTM	28,97 ^a (±2,69)	29,93 ^b (±3,25)	27,83 ^c (±2,21)	27,21 ^d (±2,64)	27,62 ^e (±2,78)
FIB	540,00 ^a (±204)	490,00 ^a (±238)	662,00 ^a (±388)	503,00 ^a (±193)	534,00 ^a (±285,00)

Legenda: M1 = momento 1 (quinze dias antes do parto), M2 = momento 2 (dia do parto), M3= momento 3 (sete dias após o parto), M4= momento 4 (quinze dias após o parto), M5= momento 5 (trinta dias após o parto). LEU: leucócitos totais, PTN: proteínas plasmáticas, HT: hematócrito, HEM: hemácias, HB: hemoglobina, VCM: volume corpuscular médio, CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média, RDW: amplitude de distribuição dos eritrócitos, PLA: plaquetas, HTM: hematócrito manual e FIB: fibrinogênio. *Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre as médias ($P \leq 0,05$).

Não houve diferença entre os momentos avaliados na contagem total de leucócitos, hemácias, CHCM, RDW, plaquetas e fibrinogênio. Enquanto isso, as variáveis proteínas totais, hematócrito manual e automático, hemoglobina e VCM demonstraram diferenças significantes entre os momentos.

Clinicamente, nenhum animal apresentou mastite durante os dias de experimento. No período avaliado, todos os dias os três primeiros jatos foram descartados, como teste de triagem para mastite clínica.

Para um possível diagnóstico de mastite subclínica, uma avaliação minuciosa da glândula mamária foi realizada. O primeiro parâmetro avaliado foi a sujidade da glândula mamária desses animais, como sugerido por Schreiner; Ruegg, (2003). O resultado está disposto na Tabela 3.

Tabela 3 – Número e a frequência de animais em relação aos escores de higiene observados nos diferentes momentos.

Higiene	M2	M3	M4	M5
Escore 1	3 (10,00%)	10 (33,33%)	14 (46,66%)	15 (50,00%)
Escore 2	14 (46,66%)	14 (46,66%)	10 (10,00%)	10 (10,00%)
Escore 3	8 (26,66%)	5 (16,66%)	2 (6,66%)	4 (13,33%)
Escore 4	5 (16,66%)	0 (0,00%)	2 (6,66%)	0 (0,00%)
Não realizado	0 (0,00%)	1 (3,33%)	2 (6,66%)	1 (3,33%)
Total amostras	30	30	30	30

Legenda: M2 = momento 2 (dia do parto), M3= momento 3 (sete dias após o parto), M4= momento 4 (quinze dias após o parto), M5= momento 5 (trinta dias após o parto). Escore 1 (E1) glândula mamária livre de sujidade, Escore 2 (E2) quando de 2 a 10% da glândula estavam comprometidas com sujidade, Escore 3 (E3) quando 10 a 30% da glândula estavam sujos e Escore 4 (E4) quando mais de 30% da glândula mamária apresentavam sujidade.

Como observado, os escores de sujidade predominantes foram o E1 e/ou E2 em todos os momentos avaliativos.

Schreiner e Ruegg (2003), confirmaram em sua pesquisa que a exposição frequente das vacas ao esterco, umidade e lama, que estão presentes nas áreas que as vacas permanecem alojadas, influenciam na taxa de mastite clínica. Isso é explicado, pois os principais patógenos presentes nesses locais acabam permanecendo mais próximos da glândula mamária, favorecendo a exposição dos animais a essas fontes potenciais.

O escore de limpeza da glândula mamária é uma ferramenta útil para monitorar a limpeza, higiene e manejo das instalações, a fim de se reduzirem casos de mastite e CCS (CÓRDOVA *et al.* 2018). Os resultados dos escores na presente pesquisa demonstram que em ambas propriedades havia um bom manejo dos dejetos, cama seca e bom dimensionamento dos animais por metro quadrado nos respectivos alojamentos. Esses fatores influenciam positivamente em boas taxas de escore higiene da glândula mamária nos rebanhos e conseqüentemente atuam na redução da incidência de mastite (MANZI *et al.* 2012; DOUPHRAATE *et al.* 2019).

Outro exame subjetivo realizado durante o experimento foi o CMT. Seus resultados estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 – Frequência de animais que apresentaram diferentes escores do CMT observados nos diferentes momentos.

CMT	M2	M3	M4	M5
Negativo	42 (35%)	76 (63,33%)	91 (75,83%)	100 (83,33%)
Traços	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
+	33 (27,5%)	26 (21,66%)	13 (10,83%)	11 (9,16%)
++	26 (21,66%)	11 (9,16%)	5 (4,16%)	3 (2,5%)
+++	19 (15,83%)	3 (2,5%)	3 (2,5%)	2 (1,66%)
Não realizado	0 (0,00%)	4 (3,33%)	8 (6,66%)	4 (3,33%)
Total amostras	120	120	120	120

Legenda: M2 = momento 2 (dia do parto), M3= momento 3 (sete dias após o parto), M4= momento 4 (quinze dias após o parto), M5= momento 5 (trinta dias após o parto). Negativo para formação de gel no teste; traços, quando houve um leve espessamento, mas sem formação de gel; 1 cruz, na qual a positividade era fraca, mas com espessamento imediato e leve formação de gel; 2 cruces, houve a formação de gel forte e 3 cruces foi quando a formação de gel foi muito forte.

Em relação aos resultados obtidos no MALDI-ToF MS (Tabela 5), foi possível observar 151 amostras positivas para mastite subclínica das 480 avaliadas. Além dessas 480, somaram-se seis amostras duplamente contaminadas (totalizando 486 avaliações). Além disso, não houve contaminação do leite coletado e enviado para a identificação de mastite, ressaltando que a mesma foi realizada da forma correta.

Tabela 5 – Quantidade e frequência de isolamento de bactérias em amostras de leite nos diferentes momentos.

	M2	M3	M4	M5	T
Negativos	81 (16,66%)	80 (16,46%)	85 (17,48%)	63 (12,96%)	309(63,58%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (0,20%)	6 (1,23%)	7 (1,44%)	17 (3,49%)	31 6,47%
<i>Streptococcus uberis</i>	1 (0,20%)				1 (0,20%)
<i>Klebsiella</i>	2 (0,41%)				2 (0,41%)
<i>Escherichia coli</i>	1 (0,20%)				1 (0,20%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (0,20%)		1 (0,20%)		2 (0,41%)
<i>Pseudomonas</i>		1 (0,20%)			1(0,20%)
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	1 (0,20%)			8 (1,64%)	9 (1,85%)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1 (0,20%)				1(0,20%)
<i>Acinetobacter shendleri</i>	1 (0,20%)	1 (0,20%)		2 (0,41%)	4 (0,82%)
<i>Acinetobacter sp.</i>	3 (0,61%)		1 (0,20%)	2 (0,41%)	6(1,23%)
<i>Acinetobacter townneri</i>		2 (0,41%)			2 (0,41%)
<i>Aerococcus viridans</i>	1(0,20%)		1 (0,20%)		2 (0,41%)
<i>Erwinia persicina</i>		2 (0,41%)	1 (0,20%)		3 (0,61%)
<i>Escherichia vulneris</i>			1 (0,20%)		1(0,20%)
<i>Pantoea sp.</i>				1(0,20%)	1(0,20%)
<i>Corynebacterium bovis</i>	1(0,20%)			5 (1,02%)	6 (1,23%)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2 (0,41%)	1(0,20%)		1(0,20%)	4 (0,82%)
<i>Staphylococcussaprophyticus</i>	1 (0,20%)				1 (0,20%)
<i>Staphylococcus simulans</i>	3 (0,61%)	3 (0,61%)	1(0,20%)	1(0,20%)	8 (1,64%)
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	19	14 (2,88%)	12 (2,47%)	15 (3,08%)	60 (12,34%)
<i>Macrooccus canis</i>	1(0,20%)				1(0,20%)
<i>Rothia endophytica</i>	1(0,20%)			1(0,20%)	2 (0,41%)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		1(0,20%)	1(0,20%)	2 (0,41%)	4 (0,82%)
<i>Staphylococcus sciuri</i>		1(0,20%)	1(0,20%)	1(0,20%)	3 (0,61%)
<i>Staphylococcus warneri</i>		1(0,20%)			1(0,20%)
Não realizados	1(0,20%)	5 (1,02%)	9 (1,85%)	5 (1,02%)	20 (4,11%)
TOTAL	123	118	121	124	486

Legenda: M2 = momento 2 (dia do parto), M3= momento 3 (sete dias após o parto), M4= momento 4 (quinze dias após o parto), M5= momento 5 (trinta dias após o parto). *Não realizados foram devido a ausência de coleta.

Avaliando cada quarto mamário isoladamente, pode-se perceber que dos 480 exames realizados, que correspondem a quatro amostras por momento, pela técnica MALDI-ToF MS, a grande maioria teve como resultado negativo (309 amostras), representando 64,37%.

A prevalência de mastite em novilhas é variável. De Vlieghe *et al.* (2012), relataram que essa enfermidade pode ocorrer antes mesmo do parto, com taxas de 29% a 75%, já a prevalência no pós-parto imediato varia de 12% a valores acima de 57% dos quartos infectados. Na presente pesquisa a taxa de quartos infectados foi de 32,09% nos primeiros trinta dias após o parto.

Já quando a avaliação foi feita por animal, ou seja, quando o animal apresentou mastite em um ou mais quartos mamários, como resultados obteve-se no M2 a ausência de microrganismos em 9 animais e 21 positivos. No M3, 8 animais apresentaram resultados negativos, 21 positivos e 1 animal não teve coleta realizada. No M4, 11 animais foram negativos, 17 positivos e 2 não coletados. Já no M5, 4 animais foram negativos, 25 positivos e em 1 animal não foi realizado o exame microbiológico.

Os principais patógenos isolados foram o *Staphylococcus chromogenes* em 60 amostras, correspondente a 12,5% das amostras. O segundo patógeno com maior ocorrência foi o *Staphylococcus aureus* em 31 amostras, representando 6,45%. Outros, como o *Acinetobacter iwoffii*, com 9 amostras positivas (1,87%), *Staphylococcus simulans* em 8 amostras (1,66%) e com 6 amostras positivas (1,25%) os patógenos *Acinetobacter sp* e *Corynebacterium bovis*. Em cinco amostras houve contaminação dupla, quatro delas com *S. aureus* e *Corynebacterium bovis* e uma com *S. aureus* e *Klebsiella*.

Em uma revisão sobre mastite em novilhas, De Vlieghe *et al.* (2012), relatam que é a alta proporção de infecções causadas pelos *Staphylococcus* não *aureus* (SNA) e destaca que *Staphylococcus aureus* juntamente com as bactérias ambientais são os principais patógenos mais prevalentes.

Esses dados vêm em concordância com os resultados da presente pesquisa, onde o *Staphylococcus chromogenes*, que é uma espécie de *Staphylococcus* não *aureus*, foi o patógeno mais prevalente, seguido do *Staphylococcus aureus*. A alta prevalência de mastite pelo *Staphylococcus aureus* emite um alerta. Esse patógeno é desafiador em qualquer propriedade e é responsável por baixas taxas de cura em infecções

intramamárias (BARKEMA, SCHUKKEN e ZADOKS, 2006).

Quando há casos de mastite subclínica o diagnóstico presuntivo dentro das fazendas é feito através da alteração de viscosidade do CMT. Aliás, esse exame deve ser utilizado na rotina de ordenha das propriedades. Muitos trabalhos já detectaram e avaliaram a eficácia desse exame, como forma de triagem e diagnóstico de mastite subclínica (SCHALM e NOORLANDER, 1957; SANFORD *et al.* 2006; SWINKELS *et al.* 2021). No entanto, não se sabe o motivo que levou a esses resultados no presente estudo.

Da mesma forma esperava-se que os resultados obtidos no escore de sujidade também influenciassem nos resultados da cultura, mas novamente o valor de P não foi significativo ($P = 0,07$). Esse valor, apesar de não significativo, demonstra uma tendência de que quando a glândula mamária se apresenta suja, a chance de ocorrer casos de mastite aumenta, devido a maior exposição da glândula perante os patógenos (SCHREINER e RUEGG, 2003).

Associadamente ao CMT e sujidade, avaliamos também a CCSMD. Os resultados estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6: Média e desvio padrão (σ) de CCSMD, demonstrando a contagem de linfócitos, macrófagos e neutrófilos nos diferentes momentos.

Variable	M2	M3	M4	M5
Lymphocyte	25,9 ^a (±14,4)	24,4 ^b (±12,6)	24,4 ^c (±11,2)	21,3 ^d (±9,1)
Macrophage	46,2 ^a (±16,0)	55,5 ^b (±16,1)	54,6 ^c (±14,6)	59,5 ^d (±12,6)
Neutrophil	27,9 ^a (±18,5)	20,1 ^b (±14,8)	21,0 ^c (±15,2)	19,2 ^d (±12,3)
Total	100	100	100	100

Legenda: M2 (dia do parto), M3 (sete dias após o parto), M3 (quinze dias após o parto), M5 (trinta dias após o parto). *Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas entre as médias ($P \leq 0,05$).

A contagem de células somáticas microscópica diferencial é considerada um método adequado e com alta correlação com a contagem de células somáticas automática (TAKANO *et al.* 2018).

Em uma glândula mamária saudável, espera-se encontrar uma população maior de macrófagos (BANNERMAN, 2004, ALNAKIP *et al.* 2014; SORDILLO, 2018;

TAKANO *et al.* 2018). Como foi percebido no presente estudo, há uma porcentagem maior de quartos negativos ao exame microbiológico. Fato esse que favorece e evidencia a presença maior de macrófagos do que células polimorfonucleares.

Como é relatado por Takano *et al.* (2018), quando a CCSMD é realizada pela técnica que emprega a citocentrifugação, com ela pode-se diferenciar as diferentes populações leucocitárias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) presentes no leite.

A CCSMD do leite serve como parâmetro para diagnosticar a mastite subclínica, visto que quando há inflamação da glândula mamária, há um aumento de células somáticas, em sua maioria, polimorfonucleares, representados pelos neutrófilos, oriundos do sangue (SOUZA *et al.* 2012).

No que diz respeito aos resultados imunológicos, foi possível observar que existe uma influência da PD-1 e CTLA-4 na ocorrência de mastite (Tabelas 7 e 8). Através da análise de estimativa de probabilidade, foi possível observar que a fazenda não promoveu influência para a ocorrência de mastite subclínica. No entanto houve uma tendência na ocorrência de mastite ($P = 0,07$), à medida que ocorreu um aumento de linfócitos PD-1, assim como há tendência quando aumentaram os linfócitos CTLA-4 ($P = 0,09$).

Houve significância estatística na contagem total de PD-1 e CTLA-4 ($P = 0,05$ e $P = 0,04$), mostrando que o aumento de ambos afetam a ocorrência de mastite.

Tabela 7 – Análise de estimativa da influência da PD-1 e CTLA – 4 na ocorrência de mastite subclínica.

Análise das Estimativas da Máxima Probabilidade					
Parâmetro	DF	Estimativa	Erro	Qui-Quadrado	P > Q.Q
Intercepção	1	3.5953	6.8592	0.2747	0.60
Fazenda	1	-2.1819	1.6555	1.7370	0.18
Linfócitos PD-1 (GM)	1	0.0931	0.0514	3.2752	0.07*
Linfócitos PD-1 (FP)	1	-0.0416	0.1643	0.0640	0.80
Linfócitos PD -1 (GM)	1	-0.0624	0.0322	3.7457	0.05 ^a
Linfócitos CTLA-4(GM)	1	-0.0806	0.0481	2.8056	0.09*
Linfócitos CTLA-4 (FP)	1	-0.0486	0.2099	0.0536	0.81
Linfócitos CTLA-4 (GM)	1	0.0650	0.0330	3.8725	0.04 ^a

Legenda: GM (geomean). FP (frequent of parent). a: houve significância estatística (demonstrando uma relação entre as variáveis). * tendência de significância estatística.

A tabela abaixo (Tabela 8), indica o quanto o aumento de PD-1 e CTLA-4 influenciaram na ocorrência de novos casos de mastite. Um resultado que merece destaque é que tanto a expressão de PD-1, quanto de CTLA- 4 nos LT influenciaram para maior ocorrência de mastite. E o aumento de casos é de 1,098 sob a influência do PD-1 e 1,067, quando influenciado pelo CTLA-4.

Tabela 8 – Análise de estimativa através de *Odds Ratio* da influência da PD-1 e CTLA – 4 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
Linfócitos CTLA-4 (GM)	0.923	0.839	1.014
Linfócitos CTLA-4 (FP)	0.953	0.631	1.437

Estimativa de Probabilidade

Efeito	Ponto estimativo	Limites de confiança (95%)	
Linfócitos CTLA-4 (GM)	1.067	1.000	1.138

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

A expressão desses pontos de controle foram mensuradas somente no pré-parto (aproximadamente 15 dias antes do parto). Com isso, pode-se perceber que quanto maior a expressão de ambos no período que antecede o parto, maior foi a ocorrência de mastite no pós-parto.

Assim como no presente trabalho, De Souza (2022), também encontrou resultados muito semelhantes em relação a ocorrência de metrite e endometrite no pós parto. Em sua pesquisa utilizaram 26 vacas leiteiras, destas 19 vacas foram multíparas e 7 foram primíparas, proveniente de duas propriedades. Houve avaliação imunológica no pré parto, dia do parto e trinta dias após o parto. Como resultados, a porcentagem de neutrófilos determinada na citologia endometrial (CE) antes do parto apresentou uma associação com a expressão de PD-1 em linfócitos T ($P = 0,02$) e uma tendência com a expressão de CTLA-4 em linfócitos T ($P = 0,086$). Os animais que apresentaram aos 30 dias pós parto, um predomínio acima de 18% de neutrófilos na CE, o que caracteriza um diagnóstico positivo para endometrite, foram os mesmos que apresentaram a maior expressão de PD-1 pelos LT ($P = 0,009$) antes do parto e também aos trinta dias após o parto.

Esses resultados veem de encontro com os do presente estudo. Em ambos, PD-1 e CTLA-4 tiveram uma maior expressão quando as enfermidades ocorreram, ou seja a mastite e endometrite.

Pomeroy *et al.* (2017) ao realizarem um estudo semelhante, por meio da avaliação da influência da contagem de monócitos no pré parto sobre a mastite e metrite, observaram que um aumento na contagem dos monócitos CD14+ aos 14 dias antes do parto aumentou a probabilidade dos animais em contraírem doenças no pós-parto.

É evidente que o tipo celular estudado é diferente, no entanto, as alterações que ocorrem no sistema imune afetam diretamente todos os tipos celulares que ali atuam. Além disso, estudos mostram que os monócitos CD14⁺ foram encontrados em enfermidades de humanos, como a sepse e alguns tipos de câncer, atenuando as respostas dos LT (MUKHERJEE *et al.* 2015; WONG *et al.* 2012), fato que também pode ocorrer nos casos de mastite, mas que no entanto não há estudos que comprovem essa tese.

Goto *et al.* (2017), sugerem que a via PD-1/PD-L1 podem estar envolvidas na exaustão imunológica dos LT específicos de micoplasma bovino. No entanto, sugerem mais estudos para tratarem sobre a via da regulação positiva.

Alguns estudos em bovinos verificaram que o bloqueio da via PD-1 conseguiu reativar as funções dos LT, como proliferação e produção de citocinas *in vitro*. No estudo realizado por Okagawa *et al.* (2016), utilizando células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células de sangue *in vitro*, mostraram que o bloqueio com gene de ativação de linfócitos 3 (LAG-3) do MHC II, reativou eficientemente os LT específicos no combate do *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*. Além disso, os LT CD8+ em PBMCs expressaram fortemente LAG-3 e responderam ao bloqueio de LAG-3 com restauração significativa da produção de IFN- γ específico para paratuberculose. Esses autores chegaram a conclusão que essa descoberta abriu uma nova perspectiva na estratégia terapêutica para a micoplasmose bovina, visando as vias dos receptores imunoinibitórios.

Como foi observado, varios estudos começaram a trabalhar com a via da regulação positiva dos LT. Com isso é possível enfatizar que os resultados da presente pesquisa representam um marco importante para as futuras terapias que poderão ser desenvolvidas para atuar nas alternativas de tratamento usando a regulação positiva do sistema imune.

Conclusão

Foi possível avaliar a influência da PD-1 e CTLA-4 na ocorrência de mastite. Concluindo que quanto maiores os valores encontrados dessas proteínas, maior a ocorrência de mastite. Esses resultados são encorajadores para trabalhar e pesquisar sobre as futuras alternativas no tratamento das enfermidades dos bovinos. Sendo a mastite, a principal enfermidade enfrentada pelos bovinos de leite, e de extrema importância econômica e produtiva, é necessário aprofundar as pesquisas sobre a via de regulação dos receptores inibitórios, buscando novas alternativas tanto para o tratamento, quanto para o controle da mastite.

Referências

- ALERI, J. W. *et al.* Associations between immune competence, stress responsiveness, and production in Holstein-Friesian and Holstein-Friesian× Jersey heifers reared in a pasture-based production system in Australia. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 4, p. 3282-3294, 2019.
- ALNAKIP, M. *et al.* The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2014, 2014.
- BANNERMAN, D. D. *et al.* The bovine innate immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 107, n. 3-4, p.201-215, 2004.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, 2006.
- BARREIRO, J. R. *et al.* Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 12, p. 5661-5667, 2010.
- BARREIRO, J. R. *et al.* Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 4, p. 2928-2934, 2017.
- BIRGEL, E. H. Semiologia da glândula mamária de ruminantes. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Editora Roca, 2014. 1406 p.
- BRADLEY, L. M. Migration and T-lymphocyte effector function. **Current opinion in immunology**, v. 15, n. 3, p. 343-348, 2003.
- BRUCKMAIER, R. M.; WELLNITZ, O. Triennial Lactation Symposium/BOLFA: Pathogen-specific immune response and changes in the blood–milk barrier of the bovine mammary gland. **Journal of animal science**, v. 95, n. 12, p. 5720-5728, 2017.
- CHEN, P. P. *et al.* Alloantigen-specific type 1 regulatory T cells suppress through CTLA-4 and PD-1 pathways and persist long-term in patients. **Science translational medicine**, v. 13, n. 617, p. 52-64, 2021.
- CHO, H. *et al.* Programmed Cell Death 1 (PD-1) and Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 (CTLA-4) in Viral Hepatitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 15-17, 2017.
- CÓRDOVA, H. A. *et al.* Influence of udder depth on cleaning teats and health of the mammary gland in robotic milking. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 1443-1452, 2018.

- CRUVINEL, W. D. M. *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-447, 2010.
- DELLA LIBERA, A. M. M. P. *et al.* Quantification of B cells and T lymphocyte subsets in bovine leukemia virus infected dairy cows. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 4, p. 1487-1494, 2012.
- 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 Dairy Science**, v.95, n.3 p.1025-1040, 2012
- DOLAN, D. E., GUPTA, S. PD-1 pathway inhibitors: changing the landscape of cancer immunotherapy. **Cancer Control**, v. 21, n. 3, pág. 231-237, 2014.
- DOUPHRATE, D. I. *et al.* Reliability of observational- and machine-based teat hygiene scoring methodologies. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n.8, p. 7494-7502, 2019.
- EDMONSON, A. J. *et al.* A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 72, n. 1, p. 68-78, 1989.
- FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Editora Roca, 2014. 1406 p.
- FOLKL, A. *et al.* Feline programmed death and its ligand: characterization and changes with feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 134, p. 107-114, 2010.
- 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.
- GUZMAN, E.*et al.* Bovine $\gamma\delta$ T cells are a major regulatory T cell subset. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 1, p. 208-222, 2014.
- HUIJPS, K.; LAM T. J.; HOGEEVEN, H. Costs of mastitis: facts and perception. **Journal of dairy Science**, v.75, n. 1, p. 113-20, 2008.
- IKEBUCHI, R. *et al.* Blockade of bovine PD-1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 59, 2013.
- JAMALI, H. *et al.* Invited review: Incidence, risk factors, and effects on clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 4729-4746, 2018.

- JEON, D. *et al.* Porcine PD-L1: cloning, characterization, and implications during xenotransplantation. **Xenotransplantation**, v. 14, p. 236-242, 2007.
- HARMON, R. J. *et al.* **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infections**. 3. ed. Arlington: VA, National Mastitis Council, 1990. 34 p.
- HOSSEINI, A. *et al.* CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. **International Immunopharmacology**, v. 80, p. 106 -121, 2020.
- MANZI, M.P. *et al.* Relationship between teat-end condition, udder cleanliness and bovine sub-clinical mastitis. **Reserch Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 430-434, 2012.
- MATSUYAMA-KATO, A. *et al.* Molecular characterization of immunoinhibitory factors PD-1/PD-L1 in chickens infected with Marek's disease virus. **Journal of Virology**, v. 9, p. 94-100, 2012.
- MCDOUGALL, S. *et al.* Parenteral treatment of clinical mastitis with tylosin base or penethamate hydriodide in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 2, p. 779-789, 2007.
- MESQUITA JÚNIOR, D. *et al.* Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 552-580, 2010.
- MUKHERJEE, R. *et al.* Non-classical monocytes display inflammatory features: validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. **Scientific Reports**, v.5, n. 1, p. 1-14, 2015.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4. ed. Verona: NMC, 2004. 47 p.
- OKAGAWA, T.*et al.* Bovine immunoinhibitory receptors contribute to suppression of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-specific T-cell responses. **Infection and immunity**, v. 84, n. 1, p. 77-89, 2016.
- POMEROY, B. *et al.* Counts of bovine monocyte subsets prior to calving are predictive for postpartum occurrence of mastitis and metritis. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 13, 2017.
- 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.
- SANFORD, C. J. *et al.* Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis Test. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, n. 1-2, p. 96-108, 2006.

- SCHALM, O. W e NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the *California Mastitis Test*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199-204, 1957.
- SCHREINER, D.A. AND RUEGG, P.L. Relationship between Udder and Leg Hygiene Scores and Subclinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3460-3465, 2003.
- 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.
- SOUZA, F. N. *et al.* The innate immunity in bovine mastitis: the role of pattern, recognition receptors. **American Journal of Immunology**, v. 8, n. 4, p. 166-178, 2012.
- SVILAND, S.; WAAGE, S. Clinical bovine mastitis in Norway. **Preventive veterinary medicine**, v. 54, n. 1, p. 65-78, 2002.
- SORDILLO, L. M. Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. *Veterinary Clinics*. **Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 507-523, 2018.
- TAKANO, P. V. *et al.* Estudo comparativo das diferentes técnicas empregadas na contagem diferencial de leucócitos no leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 773-778, 2018.
- SWINKELS, J. M. *et al.* Randomized controlled field trial comparing quarter and cow level selective dry cow treatment using the California Mastitis Test. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 8, p. 9063-9081, 2021.
- THOMPSON-CRISPI, K. *et al.* Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. **Frontiers in immunology**, v. 5 p. 493-479, 2014.
- WHERRY, E. J. T Cell Exhaustion. **Nature Immunology**, v. 12, n. 6, p. 492-499, 2011.
- WONG, K. L. *et al.* The three human monocyte subsets: implications for health and disease. **Immunologic research**, v. 53, n. 1, p. 41-57, 2012.
- YU, L. *et al.* Association of CTLA-4 (+ 49 A/G) polymorphism with susceptibility to autoimmune diseases: A meta-analysis with trial sequential analysis. **International Immunopharmacology**, v. 96, p. 107617, 2021.
- ZIGO, F. *et al.* Maintaining optimal mammary gland health and prevention of mastitis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 69, 2021.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As novilhas representam importantes fontes de reposição nos rebanhos leiteiros. Trabalhar e manejar com esses animais é sempre um desafio dentro da propriedade, principalmente porque essa categoria não oferece um retorno financeiro imediato aos proprietários.

Enfermidades que ocorrem ao redor do parto representam sempre um desafio árduo a ser cumprido. Encontrar ferramentas e alternativas não antibióticas que venham auxiliar na prevenção das enfermidades é um desafio da pesquisa mundial.

Nessa pesquisa foi demonstrado o início do estudo de uma possível ferramenta que irá atuar na modulação do sistema imune de bovinos. São resultados como esse que mostram que a pesquisa é de extrema importância em qualquer área, principalmente na área da agropecuária, que é o braço direito da economia brasileira.

6. REFERÊNCIAS

- AGHAMOHAMMADI, M. *et al.* Herd-level mastitis-associated costs on Canadian dairy farms. **Frontiers in veterinary science**, v. 5, p. 100, 2018.
- AITKEN, S.L., CORL, C. M e SORDILLO, L.M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 291-304, 2011.
- AKERS, R. M.; NICKERSON, S. C. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 275-289, 2011.
- ALERI, J. W. *et al.* Associations between immune competence, stress responsiveness, and production in Holstein-Friesian and Holstein-Friesian× Jersey heifers reared in a pasture-based production system in Australia. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 4, p. 3282-3294, 2019.
- ALLUWAIMI, A.M.; CULLOR, J.S. Cytokines gene expression. patterns of bovine milk during middle and late stages of lactation. **Journal of Veterinary Medicine**, v.49, n.2, p.105-110. 2002.
- ALNAKIP, M. *et al.* The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2014, 2014.
- ASHRAF, A., e IMRAN, M. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. **Tropical animal health and production**, v. 50, n. 6, p. 1193-1202, 2018.
- BANNERMAN, D. D. *et al.* The bovine innate immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 107, n. 3-4, p.201-215, 2004.
- BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., & DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p.113–123, 2006.
- BARRIO, M. B., RAINARD, P e POUTREL, B. Milk complement and the opsonophagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates by bovine neutrophils. **Microbial Pathogenesis**, v.34, n.1, p.1-9, 2003.
- BICALHO, R. C. *et al.* Cultura microbiológica na fazenda para tratamento de mastite clínica reduz o uso de antibióticos sem afetar os índices produtivos. **Circular Técnica do Mestrado Profissional em Desenvolvimento Rural**, v.2, n. 11, 2020.
- BLAGITZ, M. G. *et al.* Perfil celular e microbiológico do leite de ovelhas Santa Inês no período lactante e pós-desmame. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 9, p. 417-422, 2008.

- BONNEVILLE, M., O'BRIEN, R. L., e BORN, W. K. $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, n. 7, p. 467, 2010.
- BOULANGER, D. *et al.* Increased nuclear factor kappaB activity in milk cells of mastitis-affected cows. *Journal Dairy Science*, v.86, n.4, p.1259-1267, 2003.
- BRUCKMAIER, R. M., & WELLNITZ, O. Triennial Lactation Symposium/BOLFA: Pathogen-specific immune response and changes in the blood–milk barrier of the bovine mammary gland. *Journal of animal science*, v. 95, n. 12, p. 5720-5728, 2017.
- BUCHBINDER, E. I., & DESAI, A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *American journal of clinical oncology*, v. 39, n. 1, p. 98, 2016.
- CARNEIRO, D.M.V.F. **Efeito do uso de um selante interno de quartos na profilaxia de novas infecções intramamárias no período seco e no pós-parto.** 2009. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós graduação em Ciências Veterinárias, Centro Agro-Veterinário – Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC. Lages, SC.
- CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F e VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. *Ciência Rural*, v. 39, p. 1934-1943, 2009.
- CONEJEROS, I. *et al.* Induction of reactive oxygen species in bovine neutrophils is CD11b, but not dectin-1-dependent. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 139, p. 308-312, 2011.
- COSTA G.M. *et al.* Resistência a antibióticos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. *Arquivos Instituto Biológico*, v. 80, n3, p.297-30, 2013.
- CRUVINEL, W. D. M. *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, p. 434-447, 2010.
- DE VliegHER, S. *et al.* Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal 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.
- 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.
- HANAGATA, N. *et al.* Double-stranded phosphodiester cytosine-guanine oligodeoxynucleotide complexed with calcium phosphate as a potent vaccine adjuvant for activating cellular and Th1-type humoral immunities. *International Journal of Nanomedicine*, v. 20, n. 13, p. 43-62, 2017.

- HUIJPS, K.; LAM T. J.; HOGEVEEN, H. Costs of mastitis: facts and perception. **Journal of dairy Science**, v.75, n. 1, p. 113-20, 2008.
- IKEBUCHI, R. *et al.* Blockade of bovine PD-1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 59, 2013.
- IKEBUCHI, R. *et al.* Influence of PD-L 1 cross-linking on cell death in PD-L 1-expressing cell lines and bovine lymphocytes. **Immunology**, v. 142, n. 4, p. 551-561, 2014.
- JOBIM, M.; JOBIM, L. F. Células *natural killer* e vigilância imunológica. **Jornal de Pediatria**, v. 84, p. S58-S67, 2008.
- KAWAI, K. *et al.* Dynamics of lingual antimicrobial peptide, lactoferrin concentrations and lactoperoxidase activity in the milk of cows treated for clinical mastitis. **Animal Science Journal**, v.86, n.2, p.153-158, 2015.
- KIMURA, K. *et al.* Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 315-319, 1999.
- KORHONEN, H.; MARNILA, P.; GILL, H. S. Milk immunoglobulins and complement factors. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 1, p. S75-S80, 2000.
- LAGO, A. *et al.* The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 9, p. 4441-4456, 2011.
- LANGONI, H. *et al.* Quality and microbiological aspects of bovine milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011.
- LINDE, A. *et al.* Innate immunity and host defense peptides in Veterinary Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.22, n.2, p.247-265, 2008.
- LOPES JÚNIOR, J.E.F. *et al.* Relationship between total bacteria counts & somatic cell counts from mammary quarters infected by mastitis pathogens. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 691, 2012.
- LUN, S. *et al.* Total and diferencial leukocyte counts and lymphocyte subpopulations in lymph, afferent and efferent to the supramammary lymph node, during edotoxin-induced bovine mastitis. **Reproduction Domestic Animal**, v. 42, p. 126-134, 2007.
- MAGRO, G. *et al.* An explant of heifer mammary gland to study the immune response of the organ. **Research in Veterinary Science**, v. 114, p. 44-50, 2017.
- MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. J. R. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 338-344, 2000.
- MANN, S., SIPKA, A. S., & GRENIER, J. K. The degree of postpartum metabolic challenge in dairy cows is associated with peripheral blood mononuclear cell transcriptome changes of the innate immune system. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 93, p. 28-36, 2019.

MESQUITA JÚNIOR, D. *et al.* Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 552-580, 2010.

NEVES, R. B. S. **Resposta imune da glândula mamária de bovinos: específica e inespecífica-Uso de citocinas na imunomodulação**. 2011. 36p. Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Goiânia – GO.

OVIEDO-BOYSO, J. *et al.* Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of infection**, v. 54, n. 4, p. 399-409, 2007.

PAAPE, M. J. *et al.* The bovine neutrophil: structure and function. **Veterinary Research**, v. 34, p. 597-627, 2003.

POMEROY, B. *et al.* Counts of bovine monocyte subsets prior to calving are predictive for postpartum occurrence of mastitis and metritis. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 13, 2017.

RADOSTITS, O.M. *et al.* **Clínica Veterinária - Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RABOISSON, D. *et al.* The Use of Meta-Analysis for the Measurement of Animal Disease Burden: Losses Due to Clinical Mastitis as an Example. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 149, 2020.

RAINARD, P. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. **Veterinary Research**, v. 34, p. 647-670, 2003.

RAINARD, P., CUNHA, P e GILBERT, F. B. Innate and adaptive immunity synergize to trigger inflammation in the mammary gland. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. 154-172, 2016.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary research**, v. 37, n. 3, p. 369-400, 2006.

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.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Cell subpopulations and cytokine expression. In cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1077-1084, 2001.

ROWSHANRAVAN, B., HALLIDAY, N., e SANSOM, D. M. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 131, n. 1, p. 58-67, 2018.

ROSA, M. S. **Boas Práticas de Manejo – Ordenha**. Jaboticabal : Funep, 43 p, 2009

RUEGG P.L. New perspectives in udder health management. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p.149-163, 2012.

- SCHALM, O. W e NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the *California Mastitis Test*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199-204, 1957.
- SLADEK, Z., & RYSANEK, D. Apoptosis of resident and inflammatory macrophages before and during the inflammatory response of the virgin bovine mammary gland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, p. 1-13, 2010.
- SORDILLO, L. M. Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. *Veterinary Clinics*. **Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 507-523, 2018.
- SORDILLO, L.M.; STREICHER, K.L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 135-146, 2002.
- SOUZA, F. N. D. *et al.* The Innate Immunity in Bovine Mastitis: The Role of Pattern-Recognition Receptors. **American Journal of Immunology**, v. 8, n.4, p.166-178, 2012.
- SVILAND, S.; WAAGE, S. Clinical bovine mastitis in Norway. **Preventive veterinary medicine**, v. 54, n. 1, p. 65-78, 2002.
- TIZARD, Ian R. *Imunologia Veterinária*, 9ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- VARGAS, D. P. *et al.* Correlações entre contagem de células somáticas e parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade do leite. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, p. 473-483, 2014.
- VIGUIER, C. *et al.* Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 486-493, 2009.
- WHERRY, E. J. T Cell Exhaustion. **Nature Immunology**, v. 12, n. 6, p. 492-499, 2011.
- YAMAGUCHI, T. *et al.* Differential distribution of T lymphocyte subpopulations in the bovine mammary gland during lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1459, 1999.
- ZAFALON, L. F.*et al.* Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 159-163, 2005.
- ZHAO, X e LACASSE, P. Danos ao tecido mamário durante a mastite bovina: causas e controle. **Journal of Animal Science**, v. 86, n.13, p. 57-65, 2008.

7. ANEXO 1

Normas Revista Agrária Acadêmica

A Revista Agrária Acadêmica publica trabalhos regionais, nacionais e internacionais ainda não publicados, nem encaminhados a outras revistas para o mesmo fim.

Os artigos devem ser escritos em português (espanhol ou inglês) e enviados à Revista Agrária Acadêmica de forma eletrônica, diretamente para o e-mail da revista (agrariacad@gmail.com).

No corpo do e-mail enviado deve constar o tipo de trabalho que está sendo submetido (Artigos de Revisão, Artigos Científicos, Educação Continuada, Relatos de Caso, Nota Prévia e Comunicação).

Os trabalhos devem apresentar as seguintes especificações: página A4, fonte Times New Roman, corpo 12, entrelinhas 1,5, com 2cm de margem superior, inferior, esquerda e direita.

1. Os trabalhos devem conter até 20 páginas, incluindo as referências bibliográficas.
 1. 1. Informar endereço completo, telefone e e-mail para contato futuro.
 2. Serão aceitos trabalhos escritos nos seguintes idiomas: espanhol, inglês e português.
3. Apresentação dos trabalhos:
 - 3.1. Título, identificação do(s) autor(es) e ORCID de, no mínimo, um dos autores.

3.1.1 Título completo do artigo em LETRA MAIÚSCULA: em negrito, centralizado e fonte tamanho 12. Título em inglês completo do artigo em letra minúscula: centralizado e fonte tamanho 12

3.1.2 Nome completo do(s) autor(es) (por extenso e apenas o SOBRENOME EM MAIÚSCULA): alinhado à esquerda, fonte tamanho 12, com indicação para nota de rodapé.

3.1.3 Na nota de rodapé, deve constar filiação científica, na seguinte ordem: Departamento, Instituto ou Faculdade, Universidade – SIGLA – CIDADE/ESTADO – PAIS e endereço eletrônico, fonte tamanho 10.

3.1.4 Entre o título e os dados de identificação do(s) autor(es), deve existir espaço de uma linha.

3.1.5 Todos os subtítulos devem estar alinhados à esquerda, em negrito e fonte tamanho 12.

3.2. Resumo e Abstract Resumo de, no máximo, 110 palavras com até cinco palavras-chave (termos ou expressões que identifiquem o conteúdo do trabalho). O título, o resumo e as palavras-chaves deverão ser no idioma do texto. O corpo do texto pertencente ao resumo deve estar em espaçamento entre linhas simples e fonte tamanho 10. A seguir, deve constar o Abstract e Keywords, nos mesmos moldes do resumo.

3.3. Corpo do texto:

3.3.1 Subitens destacados em negrito, no mesmo corpo do texto, alinhados à esquerda.

3.3.2 Texto contendo, sempre que possível: a) Introdução (com objetivos e metodologia); b) Desenvolvimento (corpo do texto, Material e Métodos, Resultados e Discussão), c) Conclusão ou Considerações finais e Referências bibliográficas. Obs: Os artigos que, por preferência do autor, não tenham a estrutura contida neste item não serão excluídos.

3.3.3 Todo o corpo do texto deve estar em espaçamento 1,5, contendo sempre o espaço de uma linha entre os subtítulos e o texto.

3.3.4 Notas de rodapé devem ser, na medida do possível, incluídas no corpo do texto.

3.3.5 Tabelas e gráficos deverão ser numerados, sequencialmente, em algarismos arábicos e encabeçados por seus respectivos títulos.

3.3.6 Fotografias e ilustrações poderão ser coloridas e deverão ser inseridas no corpo do texto, numeradas, sequencialmente, e com legendas logo após a imagem.

3.3.7 Referências no corpo do texto deverão ser feitas pelo sobrenome do autor, entre parênteses e separado por vírgula da data de publicação e da(s) página(s) utilizada(s) tanto para citação direta como indireta. Ex: (SOUZA, 1998, p. 129). Caso o nome do autor esteja citado no texto, deverá ser acrescentada a data e paginação entre parênteses. Por exemplo, “SOUZA (2016, p. 27) aponta...”. As citações de diversas obras de um mesmo autor, publicadas no mesmo ano, deverão ser discriminadas por letras minúsculas em ordem alfabética, após a data, sem espaçamento (SOUZA, 1988a; 1989b). Quando a obra tiver até três autores, estes deverão ser separados por ponto e vírgula (SOUZA; SOUZA, 2000). No caso de três ou mais, indica-se o primeiro, seguido da expressão “et al”. (SANTOS et al., 2017). As citações literais, com mais de três linhas devem seguir este modelo, estando o texto entre linhas simples, com fonte tamanho 11, entre aspas e seguida da referência do autor, com nome, data e página referente” (SOUZA, 2001, p.38).

3.3.8 Anexos e/ou Apêndices serão incluídos somente quando imprescindíveis à compreensão do texto.

3.3.9 As linhas NÃO devem ser numeradas.

4. Referências bibliográficas:

4.1 As referências bibliográficas deverão ser arroladas no final do trabalho, pela ordem alfabética do sobrenome do(s) autor(es), obedecendo às normas mais recentes da ABNT.

5. Os trabalhos que não estiverem de acordo com estas normas de formatação serão devolvidos ao(s) autor(es); podendo ser refeitos e apresentados em outra oportunidade.

6. Os casos não previstos por estas Normas serão resolvidos pelo Conselho Editorial da Revista.

7. Submissão dos manuscritos O envio dos artigos deve ser realizado diretamente para o e-mail agrariacad@gmail.com Informações sobre o pagamento da taxa de publicação serão enviadas ao autor para correspondência. Uma vez finalizado o processo, o artigo foi enviado para publicação na edição mensal correspondente. Uma vez submetidos, os trabalhos são confidenciais até à sua publicação.