

PERFIL DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA DE VACAS LEITEIRAS SADIAS E ACOMETIDAS POR DOENÇAS UTERINAS NO PERIPARTO

ANDRESSA STEIN MAFFI¹; ANA RITA TAVARES KRAUSE²; MARCIO ERPEN LIMA²; LUIZ FRANCISCO PFEIFER²; CHARLES FERREIRA MARTINS²; CÁSSIO CASSAL BRAUNER³

¹Universidade Federal de Pelotas – andressamaffi@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- anaritatkrause@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- mcerlima@bol.com.br

²Embrapa Rondônia- luizufpel@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- martinscf68@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – cassiocb@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O período do puerpério em bovinos é caracterizado pela ocorrência de condições inflamatórias (CAPPÁ et al., 1989), resultantes da liberação de citocinas, provenientes de doenças infecciosas ou metabólicas que acometem as vacas neste período (GRIMBLE, 1990). Citocinas pró- inflamatórias são produzidas pelas células do sistema imunológico e exercem ação sobre o fígado, onde geram uma resposta de fase aguda, a partir da produção e liberação de proteínas de fase aguda positiva (+ APP) caracterizada principalmente pela haptoglobina (Hp) (FLECK, 1989) e concomitantemente diminuem a síntese hepática de proteínas de fase aguda negativa (- APP) como a albumina e a paraoxanase (PON). O reflexo destas alterações no organismo depende do tempo e quantidade de liberação, podendo causar alterações na partição de nutrientes, anorexia e alterações reprodutivas.

Dentre as principais enfermidades que desencadeiam respostas inflamatórias e imunológicas relatadas no periparto de vacas leiteiras, estão as doenças uterinas, metrite e endometrite. Muitas vacas desenvolvem infecção uterina dentro dos primeiros 21 dias pós-parto, sendo que 35% das vacas podem ser clinicamente afetadas com metrite, destas, 10 a 20% vão manter-se infectadas além deste período, caracterizando a endometrite (MCDOUGALL et al., 2007.; SHELDON et al., 2009) Estas duas enfermidades geram prejuízos em decorrência ao efeito negativo sobre a fertilidade subsequente, descarte precoce de animais e aos gastos referentes ao tratamento e descarte de leite.

A partir do conhecimento das funções das proteínas de fase aguda no organismo, associado, aos prejuízos gerados pela ocorrência de desordens do sistema reprodutivo, objetivou-se neste estudo, avaliar a relação do perfil das proteínas de fase aguda, albumina, paraoxanase e haptoglobina, durante o período de transição de vacas leiteiras e a ocorrência de doenças uterinas.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no período de dezembro de 2011 a junho de 2012, em uma fazenda leiteira localizada no município de Rio Grande/ RS, Brasil (32°16' S, 52° 32' O). Foram utilizadas 20 vacas leiteiras pluríparas (≥3 lactações), com escore de condição corporal (ECC) de 3,1 ± 0,4 e peso vivo (PV) de 629,8 ± 42,7 Kg, da raça Holandês. Estes animais eram manejados em um sistema semi-extensivo, com alimentação a base de pastagem e suplementação

com dieta concentrada após a ordenha. As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia, com intervalo entre ordenhas de 12 horas. Os animais foram selecionados pelo número de lactações, produção média em 305 dias na lactação anterior ($\geq 7.891 \pm 1.184$ kg/305 dias) e histórico negativo de enfermidades no último ano produtivo.

Nos dias -21, -14, -7 e -3 da data prevista do parto, ao parto (dia 0), e nos dias 3, 6, 9, 16, 23 e 30 pós-parto foram realizadas coletas de sangue para posterior avaliação sérica do comportamento das proteínas de fase aguda, albumina, paraoxonase e haptoglobina. O sangue foi coletado por venopunção coccígea utilizando sistema *vacutainer*. As amostras foram coletadas em tubos contendo ativador de coágulo (16x100mm, 10 ml, Vacuplast[®]/Shandong/China) centrifugados em até 30 minutos após a coleta a 1,35 x g durante 15 minutos. O soro foi separado e congelado a -80°C para posterior análise.

Para a realização das análises laboratoriais, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Os níveis de albumina foram avaliados através da técnica de espectrofotometria colorimétrica (Biospectro[®] SP - 220, Curitiba, PR, Brasil), a partir de Kit comercial (Lab Test[®], Lagoa Santa, MG). Por espectrofotometria cinética acoplada a sistema de aquecimento PTC-2 Peltier foi realizada análise sérica da atividade arilesterase da paraoxonase utilizando kit comercial (Zeptometrix[®] Corporation, Buffalo, NY, EUA). A avaliação de haptoglobina foi realizada através de leitor de placa (Thermo Plate[®], TP Reader, São Paulo, SP, Brasil). Ambos os testes apresentaram um coeficiente de variação intra e inter-ensaio < 15%.

As vacas foram examinadas ginecologicamente aos 18 \pm 2, 25 \pm 3 e 33 \pm 2 dias pós-parto por vaginoscopia e palpação retal para avaliar e caracterizar a presença de secreção uterina. Para a técnica de vaginoscopia, a vulva foi limpa com papel toalha e um espéculo vaginal higienizado foi introduzido no interior do canal vaginal e, utilizando uma fonte de luz, o canal vaginal e a cérvix foram inspecionados e a presença de secreção foi registrada. A descarga vaginal foi classificada em uma escala de 0 a 3 (0 = muco, 1 = presença de estrias de pus, 2 = \geq 50% exsudato purulento, 3 = hemorrágica e/ou com exsudato purulento).

A partir destes resultados os animais foram divididos em dois grupos experimentais de acordo com a característica da secreção vaginal, sendo o grupo controle (GC, n=8), composto por vacas que não apresentaram alteração da secreção em nenhuma das avaliações (grau 0) e o grupo doente (GD, n=12) formado por animais que apresentaram alteração da secreção (graus 1, 2, 3). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SAS 9.0, através do procedimento MIXED para avaliar os efeitos do grupo, semana e coleta. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grupo de vacas doentes apresentou menores concentrações séricas de albumina aos 21 dias pré-parto do que vacas do grupo controle (1,67 g/dL vs 2,55 g/dL, $P = 0,02$). No pós-parto, os valores da albumina se mantiveram semelhantes entre os grupos ($P > 0,05$). A paraoxonase e a haptoglobina mantiveram-se semelhantes em ambos os grupos durante todo o período estudado ($P > 0,05$).

O período de transição de vacas leiteiras apresenta consideráveis demandas energéticas, resultado do aumento das exigências pela vaca nas primeiras semanas pós-parto, estabelecendo assim um balanço negativo de energia (BEN). Este BEN provoca mudanças metabólicas no organismo, alterando o perfil lipídico e as concentrações de lipoproteínas (PYSERA e

OPALKA, 2000). Ocorre uma redução global da concentração sérica de proteínas sintetizadas pelo fígado no início da lactação, devido à mobilização de gordura como fonte de energia e deposição destas nas células do fígado. Esta lipomobilização pode ser prejudicial para função imunológica em vacas no periparto e está associada ao prolongamento da recuperação uterina no pós-parto (WATHES et al., 2009).

Em vacas manejadas em sistemas à base de pastagens, BURKE et al. (2010) e GREEN et al. (2009), observaram que animais acometidos por endometrite pós- parto apresentavam níveis inferiores de albumina a partir do pré- parto, assim como no nosso estudo.

A paraoxonase é uma proteína associada a lipoproteínas de alta densidade (HDL) no soro e apresenta efeitos antioxidantes. Um estudo realizado por TURK et al. (2004), avaliando os níveis de PON no período de transição, associou a redução desta proteína logo após o parto a uma maior mobilização de gorduras e deposição de triglicérides no fígado. BIONAZ et al. (2007), observou que animais com níveis inferiores desta proteína apresentaram efeitos mais graves da inflamação no pós-parto, e maior incidência de doenças como a metrite.

A haptoglobina é uma proteína de fase aguda positiva, que atua inibindo a proliferação bacteriana através da ligação com a hemoglobina e redução da disponibilidade de ferro. Um estudo realizado por SCHNEIDER et al. (2013) observou diferença desta proteína entre vacas pluríparas saudáveis e com doença uterina, no qual os animais doentes apresentaram níveis mais elevados de Hp no 7º dia pós parto. Estudos realizados por WILLIAMS et al. (2007) e SHELDON (2001) observaram que as concentrações de Hp se elevaram em vacas com contaminação bacteriana no útero. Como pode ser observado em outros estudos, a diferença no perfil dessas proteínas sofreu grande influência do BEN, e conseqüentemente do nível de lipomobilização. O nosso estudo foi realizado com animais manejados em sistema de pastagem, com menor desafio leiteiro, o que pode gerar diferenças com estudos em animais de alto mérito genético para produção leiteira, que tendem a sofrer mais com os efeitos da lipomobilização.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível observar que proteínas mais exigidas pelo organismo, como a albumina, apresentam concentrações inferiores em animais doentes já no pré-parto, exibindo comportamentos distintos em animais saudáveis e com doença uterina pós-parto. Este estudo mostra que as proteínas de fase aguda podem ser usadas como ferramenta para se avaliar o risco de doenças e status inflamatório de vacas leiteiras no período de transição.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 1740–1750, 2007.
- BURKE, C.R.; MEIER, S.; MCDUGALL, S.; COMPTON, C.; MITCHELL, M.; ROCHE, J. R. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 5363–5373, 2010.

- CAPPA, V.; TREVISI, E.; BERTONI, G. Variazioni ematiche e produttive nel 1° mese di lattazione in bovine di allevamenti con o senza problemi "post-partum". **Zoot. Nutr. Anim**, v. 15, p. 645–660, 1989.
- FLECK, A. Clinical and nutritional aspects of changes in acute phase proteins during inflammation. **Proceedings of the Nutrition Society**, Dublin, v. 48, p.347–354, 1989.
- GREEN, M. P.; LEDGARD, A. M.; BERG, M. C.; PETERSON, A. J.; BACK, P. J. Prevalence and identification of systemic markers of sub-clinical endometritis in postpartum dairy cows. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**. New Zealand, v. 69, p. 37–42, 2009.
- GRIMBLE, R. F. Nutrition and cytokine action. **Nutrition Research Reviews**, Belfast, v. 3, p. 193–210, 1990.
- JOHNSON, R. W.; FINCK, B. N. Tumor necrosis factor α and leptin: Two players in an animal's metabolic and immunologic responses to infection. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.79, p. 118–127, 2001.
- MCDUGALL, S.; MACAULY, R.; COMPTON, C. Association between endometritis diagnoses using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 9–23, 2007.
- TURK, R.; A.; JURETIC, GERES, D.; TURK, REKIC, B.; SIMEON-RUDOLF, V.; SVETINA, A. Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows, **Research in Veterinary Science**, Zagreb, v. 76, p. 57–61, 2004.
- PYSERA, B.; OPALKA, A. The effect of gestation and lactation of dairy cows on lipid and lipoprotein patterns and composition in serum during winter and summer feeding. **Journal of Animal and Feed Science**, v.9, p.411-423, 2000.
- SHELDON, I. M.; NOAKES, D.E.; RYCROFT, A.; DOBSON, H. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. **Veterinary Records**, North Mymms, v. 148, p.172-175, 2001.
- SHELDON, I.M.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SHUBERTH, H. J. Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. **Biology of Reproduction**. Swansea, v. 81, p.1025–32, 2009.
- SCHNEIDER, A.; CORRÊA, M. N.; BUTLER, W. R. Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in Veterinary Science**, v. 95, p. 269-271.2013.
- WATHES, D. C.; CHENG, Z. R.; CHOWDHURY, W.; FENWICK, M. A.; FITZPATRICK, R.; MORRIS, D. G.; PATTON, J.; MURPHY, J.J. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. **Physiological Genomics**, London, v. 39, p. 1–13, 2009.
- WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; NOAKES, D. E.; ENGLAND, G. E.; RYCROFT, A.; DOBSON, H.; SHELDON, I. M. Uterine infection perturbs ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, London, v. 68, p. 549-559, 2007.