

INTERAÇÃO ENTRE DOENÇAS METABÓLICAS E O SISTEMA IMUNE

Jesse P. Goff e Kayoko Kimura

Periparturient Diseases of Cattle Research Unit

National Animal Disease Center

USDA-Agricultural Research Service

Ames, IA

INTRODUÇÃO

Com grande frequência, a transição de prenhe não lactante, para não prenhe lactante, é uma experiência desastrosa para a vaca. A maioria das doenças metabólicas das vacas leiteiras – febre do leite, cetose, retenção da placenta, e deslocamento do abomaso – ocorrem durante as 2 primeiras semanas da lactação. Além das doenças metabólicas, a maioria das doenças infecciosas que acometem a vaca leiteira, particularmente a mastite, e também a paratuberculose e a salmonelose tornam-se clinicamente aparentes durante as 2 primeiras semanas da lactação.

A presente revisão estabelecerá duas premissas antes de rever os estudos correlacionando a doença metabólica com as alterações na resistência às doenças infecciosas. Uma destas premissas é que as infecções da glândula mamária são menos prováveis em animais com sistema imunológico “forte”, e que a supressão imune no periparto existe e predispõe a vaca à mastite e a outras doenças infecciosas. Esta premissa ajuda a explicar porque um animal que albergou bactérias no úbere ou no intestino, durante longo período, sem doença clínica, subitamente desenvolve a doença pouco tempo após a parição. A segunda premissa é que os testes utilizados por pesquisadores para avaliar a capacidade funcional e o número de células imunes são bastante precisos. O mérito relativo dos testes usados em diferentes laboratórios não será debatido nesta revisão. Há excelentes revisões disponíveis que apoiam estas premissas (Sordillo, et al., 1997; Burvenich, et al., 1994; Kehrli e Shuster, 1994; Tyler et al., 1993; Hogan et al., 1993; Senft e Neudecker, 1991). A presente revisão irá examinar a evidência de que, nos bovinos, a doença metabólica aumenta a suscetibilidade da vaca, principalmente no periparto, frente ao desenvolvimento de doenças infecciosas, com maior ênfase para a mastite. Depois, cada tipo de transtorno metabólico será examinado individualmente para compreender o efeito que pode ter sobre o sistema imunológico.

ASSOCIAÇÕES ENTRE DOENÇAS METABÓLICAS E MASTITE

Diversos estudos epidemiológicos demonstraram que há associação entre o desenvolvimento de doenças metabólicas e o subsequente desenvolvimento da mastite. Em um estudo em granjas leiteiras do estado de Nova York (2.190 vacas) houve associação entre a hipocalcemia do periparto ou febre do leite e mastite. A odds ratio (probabilidade de ocorrência) sugeriu que uma vaca com febre do leite tinha probabilidade 8,1 vezes maior de desenvolver mastite do que uma vaca que não tinha tido febre do leite. A odds ratio para o desenvolvimento de uma mastite por coliforme era ainda maior (odds ratio = 9,0) (Curtis et al., 1983). Em um estudo sueco, a cetose aumentou o risco de mastite em duas vezes (Oltenacu e Ekesbo, 1994). Um segundo estudo (18.110 vacas da raça Sueca Vermelha e Branca em 924 rebanhos e 14.940 vacas da raça Frísia Sueca em 772 rebanhos), verificou que o risco de mastite era maior em vacas que tinham sofrido retenção da placenta (Emanuelson et al., 1993). Em um estudo realizado com 10 rebanhos na Inglaterra, partos gemelares, distocia, retenção de membranas fetais e claudicação antes do primeiro serviço aumentaram o risco de mastite antes do primeiro serviço (Peeler et al., 1994).

A PRODUÇÃO DE LEITE AFETA O ESTADO IMUNOLÓGICO?

A função de neutrófilos e linfócitos está diminuída no periparto, especialmente na vaca leiteira (Kehrli et al., a,b). O início da produção de leite impõe enormes desafios aos mecanismos responsáveis pela homeostase de energia, proteína e minerais da vaca. O balanço negativo de energia, proteína e/ou mineral associado ao início da lactação pode ser parcialmente responsável pela imunossupressão observada em vacas leiteiras no periparto. A mastectomia de vacas prenhes remove o impacto da produção de leite e, ao mesmo tempo, se pressupõe que mantém as alterações endócrinas e outras que estão associadas com o final da prenhez e o parto. Seria de se esperar que a mastectomia melhore a função imunológica na vaca leiteira periparturiente, se a produção de leite for um fator imunossupressivo. Usando vacas Jersey múltiparas, 10 mastectomizadas e 8 intactas (todas as vacas intactas desenvolveram febre do leite), avaliamos a capacidade dos neutrófilos de matar micróbios avaliando pela atividade mieloperoxidase dos neutrófilos durante o período do periparto (Kimura et al., 1999). A atividade mieloperoxidase dos neutrófilos diminuiu igualmente nos dois grupos antes da parição. Houve rápida recuperação da atividade mieloperoxidase dos neutrófilos nas vacas mastectomizadas mas não houve recuperação nas vacas intactas após a parição durante o estudo, que fez a avaliação até 20 dias após o parto. Em vacas intactas, a produção de gama-interferon pelos linfócitos *in vitro* diminuiu significativamente no parto mas não houve redução significativa nas vacas mastectomizadas. Nas vacas intactas, todas as subpopulações de célula T (isto é, células CD3, CD4, CD8 e gama-delta positivas) diminuíram como porcentagem das células mononucleares do sangue periférico no momento da parição, enquanto que a porcentagem de monócitos aumentou. Foi demonstrado anteriormente que estas alterações da população estão associadas com a imunossupressão comumente observada em vacas periparturientes. A mastectomia eliminou estas alterações nos subconjuntos de (Kimura et al., aguardando publicação). Estes resultados sugerem: 1) a glândula mamária pode produzir substâncias que podem afetar diretamente as populações de células imunológicas, ou 2) as demandas metabólicas associadas com o início da lactação exercem impacto negativo sobre a composição das células mononucleares do sangue periférico circulantes. Vamos considerar que a segunda alternativa é a mais provável. A mastectomia exerceu forte impacto sobre dois fatores metabólicos. A mastectomia eliminou a hipocalcemia ao parto. Ao parto, a concentração plasmática dos ácidos graxos não esterificados (NEFA) aumentou de forma dramática nas vacas intactas e durante mais de 10 dias não voltou aos níveis iniciais. Por outro lado, a concentração de NEFA nas vacas mastectomizadas teve uma ligeira elevação ao parto e voltou ao nível inicial de 1 a 2 dias depois.

Está claro que a vaca intacta mobiliza quantidade muito maior de gordura corporal do que a vaca mastectomizada, sugerindo balanço energético negativo grave no início da lactação.

Mesmo com o risco de uma simplificação excessiva, o resto desta revisão irá focar de que forma os transtornos no metabolismo de cálcio (febre do leite), metabolismo de energia (cetose) e deficiência de proteína (cetose, complexo esteatose hepática) poderiam aumentar a susceptibilidade da vaca de leite à mastite.

HIPOCALCEMIA E SUSCEPTIBILIDADE À MASTITE

As vacas com febre do leite têm um risco maior de desenvolver mastite (Curtis et al., 1983). Por que?

O cálcio é necessário para que haja a contração adequada dos músculos. A hipocalcemia grave impede a contração dos músculos esqueléticos a ponto de ocorrer a síndrome clínica conhecida como febre do leite. A contração muscular é reduzida por qualquer diminuição no cálcio do sangue, mas é preciso que seja muito grave antes de observarmos a “vaca caída”. Daniel et al. (1983) demonstraram que a taxa de contração e a força do músculo liso do trato intestinal são diretamente proporcionais à concentração sanguínea de cálcio. O esfíncter do teto é formado por músculo liso, que precisa se contrair para que haja o fechamento da extremidade

do teto. Se baixos níveis sanguíneos de cálcio reduzem a contração do esfíncter do teto, o canal do teto pode permanecer aberto, permitindo que patógenos do ambiente entrem na glândula mamária. Geralmente associamos a febre do leite com o dia da parição, mas demonstramos que muitas vacas permanecem com hipocalcemia subclínica durante a primeira semana de lactação (Goff et al., 1996). As vacas hipocalcêmicas tendem a passar mais tempo deitadas do que os animais normocalcêmicos. Mais uma vez, isto poderia aumentar a exposição da extremidade do teto aos oportunistas ambientais.

As células imunes precisam ser capazes de perceber o que está acontecendo em seu redor e reagir. Os macrófagos, por exemplo, ingerem os materiais estranhos que encontram pela frente. Os receptores da célula reagem à ligação pelos ligantes convertendo um sinal extracelular em um evento intracelular – um evento denominado transdução de sinal. A alteração da concentração intracelular de cálcio é um segundo mensageiro comum de muitas respostas imunológicas mediadas pelos receptores celulares. Em alguns casos, a interação receptor-ligante abre canais de íons que permitem que o cálcio extracelular penetre no citosol, elevando o cálcio intracelular. Sabemos que as lectinas vegetais usadas para estimular a divisão das células T *in vitro* abrem os canais de cálcio na membrana celular. Uma queda de 50% na concentração extracelular de cálcio ionizado, típico da vaca com febre do leite, poderia retardar a entrada de cálcio extracelular através dos canais de cálcio da membrana, enfraquecendo desta forma a resposta da célula. Normalmente, a concentração extracelular de cálcio é cerca de 10.000 vezes maior do que a concentração intracelular. Será que uma redução para apenas 5.000 vezes maior ter importantes efeitos sobre o sistema imunológico? Nenhum trabalho de pesquisa *in vivo* foi feito até agora para examinar esta possibilidade.

Na maioria dos casos, entretanto, a interação receptor-ligante ativa as proteinaquinas e as fosfolipases que, através de uma série de eventos (produção de inositol trifosfato, por exemplo), provoca a liberação para o citosol do cálcio das reservas intracelulares localizadas na mitocôndria e no retículo endoplasmático. Uma elevação no cálcio intracelular é um dos sinais necessários para a ativação das células T. Kimura et al. (2001) usaram corantes sensíveis a cálcio para monitorar a concentração de cálcio intracelular por citometria de fluxo. Células mononucleares do sangue periférico de 13 vacas Jersey periparturientes foram isoladas e estimuladas (usando anticorpo monoclonal para CD3 ou peróxido de hidrogênio). A concentração intracelular de cálcio foi medida por análise relacionométrica da relação fluo-4/fura red por citometria de fluxo. A concentração plasmática de cálcio alcançou o ponto mais baixo ao parto, cerca de 6 mg/dl. A resposta de cálcio intracelular aos estímulos tendeu a diminuir ao parto e foi bastante aumentada após o parto. O tamanho da reserva de cálcio intracelular foi estimado pela análise do aumento de cálcio intracelular após estimulação na presença de meio sem cálcio (isto é, sem cálcio extracelular) e na presença de pervanadato e ionomicina, que bloqueiam a captação de cálcio de volta para a mitocôndria e o retículo endoplasmático. As reservas de cálcio intracelular também alcançaram o ponto mais baixo ao parto. Estes dados sugerem que a hipocalcemia comumente observada em vacas leiteiras no periparto reduz as reservas de cálcio intracelular, reduzindo a capacidade das células de responder a estímulos ativantes.

Um outro estudo interessante foi conduzido por Sweiringa et al. (1976). A injeção de hemácias de carneiro em ratos estimula a síntese esplênica de DNA, o que eventualmente resulta em elevação no nível circulante de anticorpos. Se 24 horas antes da injeção de hemácias de carneiro removessem as glândulas paratireóides dos ratos, causando hipocalcemia aguda, a resposta proliferativa das células esplênicas era bastante reduzida. Se removessem as glândulas paratireóides depois que as hemácias de carneiro tinham sido administradas, a resposta das células do baço era normal. Estes dados sugerem que o hormônio da paratireóide e o cálcio poderiam afetar a resposta imunológica, porque afetam a fase proliferativa desta resposta.

Para a vaca, a hipocalcemia também age como agente estressor. Em geral, as vacas apresentam aumento de 3 a 4 vezes no cortisol plasmático próximo ao parto. As vacas com hipocalcemia subclínica, entretanto, podem ter aumentos de 5 a 7 vezes no cortisol plasmático no dia da parição e a vaca com febre do leite pode apresentar concentrações plasmáticas de cortisol que são 10 a 15 vezes maiores do que a concentração

plasmática de cortisol antes do parto (Horst e Jorgensen, 1982). Geralmente cortisol é considerado como um poderoso agente imunossupressor, capaz de exacerbar a imunossupressão normalmente observada no período do periparto. Exacerba mais do que causa, uma vez que a maioria dos estudos sugere que a imunossupressão se inicia 1 a 2 semanas antes do parto (Kehrli et al., 1989, Ishikawa et al., 1987, Kashiwazaki et al., 1985), e o pico de cortisol está limitado ao dia do parto e talvez o dia seguinte ao parto.

Apesar da forte conjuntura epidemiológica e a evidência de que as reservas intracelulares de cálcio podem ter sofrido uma depleção na vaca hipocalcêmica, não conseguimos demonstrar uma queda maior na função imunológica na vaca periparturiente hipocalcêmica do que na vaca periparturiente normocalcêmica.

Para induzir hipocalcemia, alimentamos 10 vacas Holandeses mais velhas com uma dieta pré-parto rica em cálcio e rica em cátions (Kehrli e Goff, 1989; Kehrli et al., 1990). Cinco vacas receberam injeções diárias de hormônio da paratireóide durante alguns dias antes do parto e nos primeiros dias de lactação para prevenir que a hipocalcemia se desenvolvesse. As vacas controle desenvolveram hipocalcemia moderada ao parto e uma das cinco desenvolveu febre do leite clínica. Contudo, todas as vacas tiveram o mesmo grau de leucopenia (que pode ser atribuída a uma neutropenia absoluta e relativa) durante a primeira semana após a parição, uma diminuição da atividade da congulinina sérica durante as três primeiras semanas após o parto, e uma diminuição da concentração sérica de IgG1 durante a semana 3 antes da parição. Todas as vacas apresentaram perda grave, similar, da função das células imunes nas semanas em torno do parto. A função dos neutrófilos (mieloperoxidase, quimioluminescência nativa, citotoxicidade dependente de anticorpo mediada por células, redução do citocromo C) e a função dos linfócitos (respostas proliferativas a lectinas) foram similares nas vacas hipocalcêmicas e normocalcêmicas. Em geral, estes testes funcionais exigiam que as células sendo examinadas fossem colocadas em meio de cultura, geralmente preparado de forma a conter o mesmo nível de cálcio ionizado que o observado em vacas normais – cerca de 1,0 mM. Será que as condições dos testes *in vitro* podiam ter negado o efeito que a hipocalcemia *in vivo* pode ter tido sobre a função da célula imune? Se acreditarmos que os nossos testes nos deram uma descrição verdadeira do efeito da hipocalcemia, poderíamos concluir que o grau de hipocalcemia observado não teve influência grande ou irreversível sobre a função de neutrófilos e linfócitos nas vacas periparturientes. A evidência epidemiológica do aumento da mastite em vacas que desenvolvem a febre do leite deve, por isso, ser o resultado sobretudo da maior exposição da extremidade do teto à contaminação ambiental.

CETOSE E SUSCEPTIBILIDADE À MASTITE

A cetose é diagnosticada sempre que há elevação dos níveis de cetona no sangue, na urina ou no leite da vaca. A doença é sempre caracterizada também por queda na glicemia. Na lactação, a quantidade de energia necessária para a manutenção dos tecidos corporais e para a produção de leite ultrapassa a quantidade de energia que a vaca obtém da dieta, especialmente no início da lactação quando o consumo de matéria seca ainda é baixo. Como resultado, a vaca precisa utilizar a gordura corporal como fonte de energia. Toda vaca em boas condições irá utilizar suas reservas no início da lactação para ajudá-la a produzir leite. Contudo, há um limite para a quantidade de ácidos graxos com que podem ser manipulados e usados como energia para o fígado (e, até um certo ponto, também por outros tecidos do organismo). Quando este limite é alcançado, as gorduras já não são mais queimadas para obtenção de energia mas começam a se acumular dentro das células hepáticas sob forma de triglicérides. Alguns dos ácidos graxos são convertidos em cetonas. O aparecimento destas cetonas no sangue, leite e urina é diagnóstico de cetose. À medida que a gordura se acumula no fígado ela reduz a função hepática – e na vaca leiteira a principal função do fígado é produzir glicose.

Grummer, 1993 demonstrou a importância do consumo de ração no parto sobre a etiologia da síndrome esteatose-cetose. Em média, o consumo de matéria seca cai 20-30% 1 ou 2 dias antes do parto, e só se recupera

1 ou 2 dias depois do parto (Bertics et al., 1992, Marquardt et al., 1977). Curiosamente, biópsias hepáticas mostraram que o nível de triglicérides do fígado triplicou até o dia do parto. O acúmulo de triglicérides neste órgão é um fenômeno muito mais precoce do que se supunha anteriormente. Ainda mais interessante é o fato de que, quando as vacas estavam com fístulas ruminais e não se permitiu que o consumo de matéria seca caísse próximo ao momento do parto (a alimentação foi forçada pela fístula ruminal), os triglicérides e os lipídeos do fígado aumentaram apenas um pouco. Resultados semelhantes foram observados com administração oral diária de propileno glicol (1 l/dia) às vacas durante a semana anterior e posterior ao parto (Studer, et al., 1993).

A conclusão é que o consumo de energia não pode ser prejudicado nos dias próximos ao parto. Qualquer fator que restrinja o consumo alimentar nessa época (tal como febre do leite ou retenção da placenta) aumenta o acúmulo de gordura no fígado, o que afeta o déficit de energia da vaca e aumenta o risco de esteatose-cetose.

A vaca recém parida também está em balanço protéico negativo logo depois do parto. Em geral, isto não é considerado como um problema tão importante quanto o balanço energético negativo do início da lactação, mas a vaca perde, em geral, 16,8 kg de proteína corporal durante as duas primeiras semanas de lactação. Grande parte desta proteína corporal está sendo usada para atender as necessidades de aminoácidos e glicose da produção de leite (Paquay et al., 1972). Por isso, em muitos aspectos, a vaca leiteira em início de lactação está em um estado fisiológico comparável ao do homem e dos roedores com uma restrição prolongada de proteínas-calorias. A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no músculo e no plasma do homem e é utilizada em altas taxas por células em divisão rápida, incluindo os leucócitos, para proporcionar energia e condições ideais para a biossíntese de nucleotídeo. Assim sendo, é considerada como essencial para uma função imunológica apropriada. No homem, a glutamina sérica diminui em pacientes com diabetes mellitus não tratada, acidose metabólica induzida pela dieta e no período de recuperação após exercício intermitente de alta intensidade (Walsh et al., 1998). É interessante que a glutamina plasmática não parece diminuir na vaca leiteira no parto – quando a mobilização de gordura corporal aumenta rapidamente e possivelmente o catabolismo da proteína também estaria aumentando rapidamente. Contudo, a glutamina plasmática diminui à medida que a vaca avança pelas primeiras semanas de lactação (Zhu et al., 2000, Meijer et al., 1995).

A relativa deficiência de caloria-proteína do início da lactação tem impacto sobre a resposta imunológica da vaca? No homem, a restrição proteína-caloria tem graves efeitos sobre a imunidade mediada por células. Muitas vezes há atrofia disseminada de tecidos linfóides e isto pode causar queda de 50% no número de células T circulantes. É surpreendente que as respostas de anticorpos estejam intactas e a fagocitose das bactérias é relativamente normal. A destruição das bactérias no interior dos fagócitos, entretanto, está comprometida (Roitt, 1991). A restrição calórica moderada (com ou sem severa restrição na ingestão de gordura) tem sido usada para atenuar os efeitos da doença autoimune, possivelmente reduzindo a resposta imunológica mediada por células (Leiba et al., 2001).

Em camundongos, a desnutrição leva à disfunção imunológica com grande aumento da morbidade. O macrófago desempenha papel importante como imune efetor e também nas funções autorregulatório, e é crítico para os mecanismos de defesa do hospedeiro. Nos camundongos, a desnutrição resulta em disfunção imunológica com morbidade bastante aumentada. Macrófagos peritoneais foram isolados de camundongos alimentados *ad lib* ou com dietas com restrição calórica durante 21 dias. Estas restrições eram equivalente à diminuição de 21,9% na ingestão calórica. Depois da estimulação dos macrófagos cultivados com lipopolissacarídeos, a prostaglandina E2 foi determinada no sobrenadante e mostrou-se significativamente elevada nos macrófagos dos camundongos com restrição calórica em comparação com os camundongos alimentados *ad lib* (Stapleton et al., 2001). A prostaglandina E2 é geralmente considerada como um agente imunossupressor, especialmente quando liberado de tecidos danificados (Roitt, 1991). Camundongos alimentados com dietas deficientes em proteína, e experimentalmente infestados com parasitas, tiveram cargas de vermes significativamente mais altas do que os camundongos alimentados com níveis adequados

de proteína (Boulay et al., 1998). Camundongos C57Bl/6 que receberam uma dieta com baixos teores de calorias demonstram redução acentuada na proliferação de linfócitos específicos, antígeno dependentes, e na resposta de anticorpos quando comparados com camundongos alimentados *ad libitum*. A depressão da resposta de linfócitos observada nos animais com restrição calórica é atribuída a um defeito nos macrófagos e células T no processamento do antígeno, apresentação e/ou proliferação (Christadoss et al., 1984).

Sabemos muito pouco sobre o efeito que a restrição proteína/energia pode ter sobre a função imunológica de bovinos. Um pequeno estudo examinou o efeito da restrição proteína/energia durante 133 dias em nove vacas infectadas com tuberculose. A restrição da dieta não resultou em nenhuma redução significativa na sensibilidade da pele ao PPD, produção *in vitro* de IFN-gama ou blastogênese de linfócitos. O número de células BoCD4+ e células B circulantes foi similar tanto nos bovinos desnutridos como no grupo controle. Entretanto, números menores ($P < 0,01$) de células BoCD2+, células BoCD2+, células BoCD8+, células gama delta T e células ACT2+ foram observadas nos animais desnutridos (Doherty et al., 1996).

Como resultados dos estudos feitos com pessoas diabéticas com cetoacidose, há uma preocupação de que os corpos cetônicos circulantes possam afetar diretamente o sistema imunológico (Gregory et al., 1993). Diversos estudos observaram qual o efeito que a adição de cetonas e/ou glicose ao meio usado para a cultura de leucócitos bovinos normais poderia ter sobre a sua função. Franklin et al. (1991) examinaram os efeitos de beta-hidroxibutirato, acetoacetato, acetona, acetato, butirato, e glicose sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos estimulados com concanavalina A, fitohemaglutinina-P ou mitógeno *Phytolacca decandra* L (“pokeweed”). Nas concentrações que ocorrem *in vivo*, cetonas, butirato e glicose tiveram efeitos mínimos sobre a proliferação *in vitro* de linfócitos bovinos. A proliferação somente foi inibida por níveis muito elevados de beta-hidroxibutirato. Nonnecke et al. (1992) examinaram o efeito de cetonas e glicose sobre a secreção *in vitro* de imunoglobulina pelos linfócitos. Os resultados dos experimentos que avaliaram os efeitos das concentrações de glicose sobre a secreção de IgM indicaram que a concentração plasmática de glicose associada ao estado cetótico (1,66 mM), quando comparado com a concentração plasmática normal de glicose (3,33 mM) não afetou a secreção de IgM total ou antígeno específico. Adicionar uma mistura de cetonas ao meio de cultura similar ao nível plasmático de vacas gravemente cetóticas inibiu a secreção de IgM mitógeno induzida em culturas com 11,1 mM de glicose suplementar, mas não em culturas com 3,33 ou 1,66 mM de glicose. Altos níveis de cetona e de glicose plasmática podem ser mais similares ao estado ceto-acidótico, e poderiam ajudar a explicar os déficits imunológicos observados nos diabéticos. Estes dados indicam que os efeitos de cetonas e acetato sobre a secreção de IgM dependem da concentração de glicose na cultura, e sugerem que as alterações nas concentrações plasmáticas de glicose, cetona e acetato, associadas com a cetose dos bovinos, não alteram a secreção de IgM *in vivo*. Trabalhando com ovinos, Sartorelli et al. (2000) determinaram que somente beta-OH butirato, nas concentrações observadas na cetose branda, poderia diminuir a atividade bactericida. Hoebe et al. (1997) verificaram que butirato em nível consistente com cetose branda (1 a 2,5 mM) era capaz de reduzir a explosão respiratória (burst) de neutrófilos bovinos. Ainda não foi esclarecido de que forma o butirato afeta as células.

Alguns estudos foram realizados com linfócitos isolados diretamente de vacas normais e vacas com cetose clínica e subclínica, e depois colocados no meio de cultura. Os leucócitos de vacas com sintomas clínicos e a concentração sanguínea mais elevada de cetonas e ácidos graxos livres responderam com os níveis mais baixos de interferon alfa e gama aos três indutores de interferon: vírus da doença de Newcastle, fitohemaglutinina e concanavalina A. Também foi observada uma correlação entre o estágio da cetose e o nível de produção de interferon nos leucócitos do leite (Kandefer-Szerszen et al., 1992).

Zerbe et al. (2000) examinaram a relação entre o teor de triacil glicerol no fígado e as propriedades imunofenotípicas e funcionais dos neutrófilos de vacas leiteiras no período periparto. Um maior teor de TAG no fígado, sendo $> 40\text{mg/g}$ considerado como o limite superior normal, acompanhou de maneira paralela a redução da expressão de moléculas de superfície associadas à função de neutrófilos do sangue. Além disso,

nas vacas com níveis mais altos de TAG houve acentuada redução da citotoxicidade celular (AICC, ADCC), dependente e independente do anticorpo, dos polimorfonucleares (PMN) do sangue. Os PMN também foram menos capazes de gerar espécies reativas de oxigênio após estimulação com acetato de forbol miristato.

QUAL É O CUSTO ENERGÉTICO PARA MONTAR UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA?

Pouco ou nada tem sido feito para examinar esta questão em bovinos. No entanto, pessoas com infecção grave levando a septicemia (vários graus de febre, aumento da contagem de leucócitos e fase aguda de produção de proteína), o dispêndio energético em repouso (determinado por calorimetria indireta) aumentou progressivamente ao longo da primeira semana de infecção, chegando a 40% acima do normal, e ainda estava elevado 3 semanas após o início da doença. Como um comentário à parte, durante um período de 3 semanas os pacientes tinham perdido 13% de sua proteína corporal total (Plank e Hill, 2000).

Este tipo de medidas não foi relatado para bovinos. Contudo, se pudermos extrapolar e especular, podemos fazer alguns cálculos. A energia para manutenção de uma vaca leiteira de 600 kg é aproximadamente 9,7 Mcal energia líquida / dia. Se a vaca precisar aumentar em 40% o seu gasto energético para montar uma resposta inflamatória, suas necessidades de energia aumentam em quase 4 Mcal / dia. Grosso modo, isto equivale a exigir que a vaca consuma 2,4 kg a mais da dieta (pressupondo que a dieta forneça 1,65 Mcal energia líquida / kg). Podemos esperar que a vaca periparturiente, que já está em balanço energético negativo, monte com sucesso uma resposta imunológica rápida? Se ela estiver de fato também em balanço protéico negativo, o seu sistema imunológico irá produzir as imunoglobulinas de fase aguda necessárias para lutar contra uma infecção, enquanto ainda está na fase aguda, para impedir que evolua para uma infecção clínica?

MASTITE E RETENÇÃO DA PLACENTA

Existe alguma associação entre o desenvolvimento de retenção da placenta (PR) e a incidência de mastite (Emanuelson et al., 1993; Peeler et al., 1994). Recentemente confirmamos estudos iniciados por Gunnink (1984), que sugeriu que os dois fatos estão ligados, porque ambos são devidos à imunossupressão nas vacas afetadas. A teoria de Gunnink sugeriu que a placenta fetal precisa ser reconhecida como tecido “estranho” e ser rejeitada pelo sistema imunológico depois do parto para que haja a sua expulsão. Levantamos a hipótese de que o comprometimento da função dos neutrófilos causa a retenção da placenta. Consideramos a hipótese de que o neutrófilo com função comprometida provoca retenção da placenta. Examinamos a capacidade dos neutrófilos de reconhecer o tecido do cotilédone fetal, como foi determinado por um teste de quimiotaxia, que utilizou um homogeneizado de placenta obtido de uma placenta expelida espontaneamente como o quimioatraente. A capacidade de matar do neutrófilo também foi estimada, determinando a atividade da mieloperoxidase em neutrófilos isolados. Amostras de sangue foram obtidas de 142 vacas leiteiras periparturientes de 2 rebanhos. Vinte animais desenvolveram RP (14,1 %). Os neutrófilos isolados do sangue de vacas com RP tiveram função significativamente mais baixa nos dois testes feitos antes do parto, e este comprometimento da função perdurou por 1 a 2 semanas depois do parto. Anticorpos direcionados contra interleucina-8 (IL-8) foram adicionados à preparação de cotilédone usada como quimioatraente inibiram a quimiotaxia em 41%, sugerindo que IL-8 é um dos quimioatraentes presentes ao parto no cotilédone. No parto, a concentração plasmática de IL-8 foi mais baixa nas vacas com RP (51 ± 12 pg/ml) do que nas vacas que expeliam normalmente a placenta (134 ± 11 pg/ml) (Kimura et al., 2002). Estes dados sugerem que a função dos neutrófilos determina se a vaca vai ou não desenvolver RP. Estes dados sugerem ainda que a menor produção de IL-8 pode ser um fator afetando a função dos neutrófilos nas vacas que apresentam RP.

Esta supressão do sistema imunológico também poderia explicar porque algumas vacas são mais susceptíveis a mastite. A retenção da placenta provavelmente não causa a mastite, mas é sintomática de um sistema imunológico deprimido.

REFERÊNCIAS

- Bertics, S. J., R. R. Grummer, C. Cadorniga-Valino, D. W. LaCount, E. E. Stoddard. 1992. Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early postpartum lactation. *J. Dairy Sci.* 75:1914.
- Boulay M, Scott ME, Conly SL, Stevenson MM, Koski KG. 1998. Dietary protein and zinc restrictions independently modify a *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda) infection in mice. *Parasitology* 116 (Pt 5):449-62
- Burvenich C, Paape MJ, Hill AW, Guidry AJ, Miller RH, Heyneman R, Kremer WD, Brand A. 1994. Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving. *Vet Q.* 16:45-50.
- Christadoss P, Talal N, Lindstrom J, Fernandes G. 1984. Suppression of cellular and humoral immunity to T-dependent antigens by calorie restriction. *Cell Immunol.* 88(1):1-8.
- Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Powers PA, Smith MC, White ME, Hillman RB, Pearson EJ. 1983. Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. *J Am Vet Med Assoc.* 183(5):559-61.
- Daniel, R. C. W. 1983. Motility of the rumen and abomasum during hypocalcaemia. *Can. J. Comp. Med.* 47:276.
- Doherty ML, Monaghan ML, Bassett HF, Quinn PJ, Davis WC. 1996. Effect of dietary restriction on cell-mediated immune responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol* 49(4):307-20
- Emanuelson U, Oltenacu PA, Grohn YT. 1993. Nonlinear mixed model analyses of five production disorders of dairy cattle. *J Dairy Sci.* 76:2765-72.
- Franklin ST, Young JW, Nonnecke BJ. 1991. Effects of ketones, acetate, butyrate, and glucose on bovine lymphocyte proliferation. *J Dairy Sci* 1991 74:2507-14
- Goff JP, Horst RL, Jardon PW, Borelli C, Wedam J. 1996. Field trials of an oral calcium propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 79:378-83.
- Gregory R, McElveen J, Tattersall RB, Todd I. 1993. The effects of 3-hydroxybutyrate and glucose on human T cell responses to *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 7:315-20
- Grummer, R. R. 1993. Etiology of lipid related disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:3882.
- Gunnink, J. W. 1984. Pre-partum leucocytic activity and retained placenta. *Vet. Q.* 6: 52-54.
- Hoeben D, Heyneman R, Burvenich C. 1997. Elevated levels of beta-hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol.* 58:165-70
- Hogan JS, Weiss WP, Smith KL. 1993. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *J Dairy Sci.* 76(9):2795-803.

- Horst, R. L., and N. A. Jorgensen. 1982. Elevated plasma cortisol during induced and spontaneous hypocalcemia in ruminants. *J. Dairy Sci.* 65:2332.
- Ishikawa, H. 1987. Observation of lymphocyte function in perinatal cows and neonatal calves. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49:469.
- Kandefer-Szerszen M, Filar J, Szuster-Ciesielska A, Rzeski W. 1992. Suppression of interferon response of bovine leukocytes during clinical and subclinical ketosis in lactating cows. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 99:440
- Kashiwazaki, Y., Y. Maede, and S. Namioka. 1985. Transformation of bovine peripheral blood lymphocytes in the perinatal period. *Jpn. J. Vet. Sci.* 47:337.
- Kehrli, Jr., M. E., B. J. Nonnecke, and J. A. Roth. 1989a. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50:207.
- Kehrli, Jr., M. E., B. J. Nonnecke, and J. A. Roth. 1989b. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50:215.
- Kehrli ME Jr, Goff JP. 1989. Periparturient hypocalcemia in cows: effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function. *J Dairy Sci.* 72:1188-96.
- Kehrli ME Jr, Goff JP, Harp JA, Thurston JR, Norcross NL. 1990. Effects of preventing periparturient hypocalcemia in cows by parathyroid hormone administration on hematology, conglutinin, immunoglobulin, and shedding of *Staphylococcus aureus* in milk. *J Dairy Sci.* 73(8):2103-11.
- Kehrli ME Jr, Shuster DE. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 77(2):619-27.
- Kimura K, Goff JP, Kehrli ME Jr. 1999. Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 82:2385-92.
- Kimura, K, J. P. Goff, M. E. Kehrli, Jr., and T. A. Reinhardt. 2002 Decreased Neutrophil Function as a Cause of Retained Placenta in Dairy Cattle. *J Dairy Sci.* IN PRESS.
- Kimura, K., Goff, JP, Reinhardt, TA. 2001. Parturition blunts calcium signals in immune cells. Abstract presented at Great Lakes Immune Fluorescence Conference, October 2001, Milwaukee, WI.
- Leiba A, Amital H, Gershwin ME, Shoenfeld Y. 2001. Diet and lupus. *Lupus* 10:246-8.
- Marquardt, J. P., R. L. Horst, and N. A. Jorgensen. 1977. Effect of parity on dry matter intake at parturition in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 60:929.
- Meijer GA, Van der Meulen J, Bakker JG, Van der Koelen CJ, Van Vuuren AM. 1995. Free amino acids in plasma and muscle of high yielding dairy cows in early lactation. *J Dairy Sci.* 78:1131-41.
- Nonnecke BJ, Franklin ST, Young JW. 1992. Effects of ketones, acetate, and glucose on in vitro immunoglobulin secretion by bovine lymphocytes. *J Dairy Sci* 75:982-90.
- Oltenu PA, Ekesbo I., 1994. Epidemiological study of clinical mastitis in dairy cattle. *Vet Res.* 25:208-12.
- Paquay R, de Baere R, Lousse A. 1972. The insensible loss of weight in dairy cows. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd.* 30(4):202-7.
- Peeler EJ, Otte MJ, Esslemont RJ. 1994. Inter-relationships of periparturient diseases in dairy cows. *Vet Rec.* 134:129-32.

- Plank LD, Hill GL. 2000. Sequential metabolic changes following induction of systemic inflammatory response in patients with severe sepsis or major blunt trauma. *World J Surg* 24:630-8
- Roitt, I. M. 1991. *Essential Immunology*, Seventh edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England. P. 170.
- Sartorelli P, Paltrinieri S, Comazzi S. 2000. Non-specific immunity and ketone bodies. II: In vitro studies on adherence and superoxide anion production in ovine neutrophils. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 47:1-8
- Senft B, Neudecker J., 1991. Defense mechanisms of the bovine mammary gland. *Tierarztl Prax.* 19(4):357-63.
- Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci.* 80:1851-65.
- Stapleton PP, Fujita J, Murphy EM, Naama HA, Daly JM. 2001. The influence of restricted calorie intake on peritoneal macrophage function. *Nutrition.* 17:41-5.
- Studer, V. A., R. R. Grummer, S. J. Bertics, C. K. Reynolds. 1993. Effect of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:2931
- Swierenga SH, MacManus JP, Braceland BM, Youdale T. 1976. Regulation of the primary immune response in vivo by parathyroid hormone. *J Immunol* 117(5 Pt 1):1608-11.
- Tyler JW, Cullor JS, Ruffin DC. 1993. Immunization and immunotherapy for mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 9:537-49.
- Walsh NP, Blannin AK, Robson PJ, Gleeson M. 1998. Glutamine, exercise and immune function. Links and possible mechanisms. *Sports Med* 26:177-191
- Zerbe H, Schneider N, Leibold W, Wensing T, Kruip TA, Schuberth HJ. 2000. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 54:771-86
- Zhu LH, Armentano LE, Bremmer DR, Grummer RR, Bertics SJ. 2000. Plasma concentration of urea, ammonia, glutamine around calving, and the relation of hepatic triglyceride, to plasma ammonia removal and blood acid-base balance. *J Dairy Sci* 83:734-40.