



FACULDADE DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICAS VETERINÁRIA
www.ufpel.edu.br/nupeec



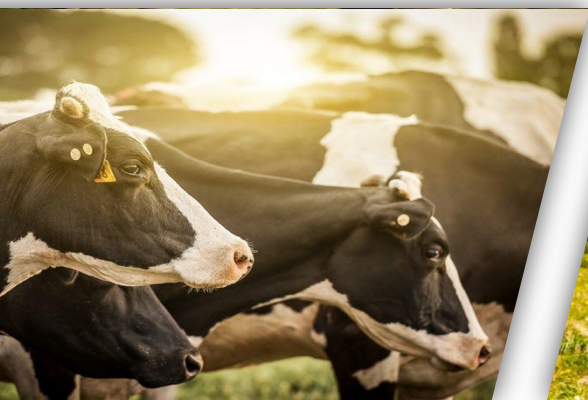
PAINEL TEMÁTICO



FACULDADE DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICAS VETERINÁRIA
www.ufpel.edu.br/nupeec



RESPOSTA IMUNE INATA GERADA APARTIR DE ESTRESSES METABÓLICOS PODE SER DETECTADA NO LÍQUIDO RUMINAL



Pelotas, 18 de julho de 2018



Giuliana de Avila Ferronato
Graduanda em Biotecnologia



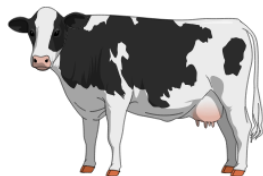
Milene Lopes dos Santos
Graduanda em Zootecnia



Matheus Lopes
Doutorando Biotecnologia

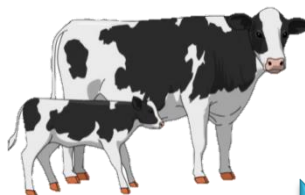


Introdução



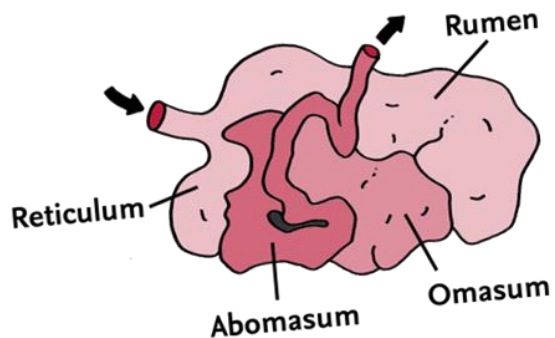
3 SEMANAS

PARTO



3 SEMANAS

Desafio
Desafio
Desafio
Desafio
Desafio



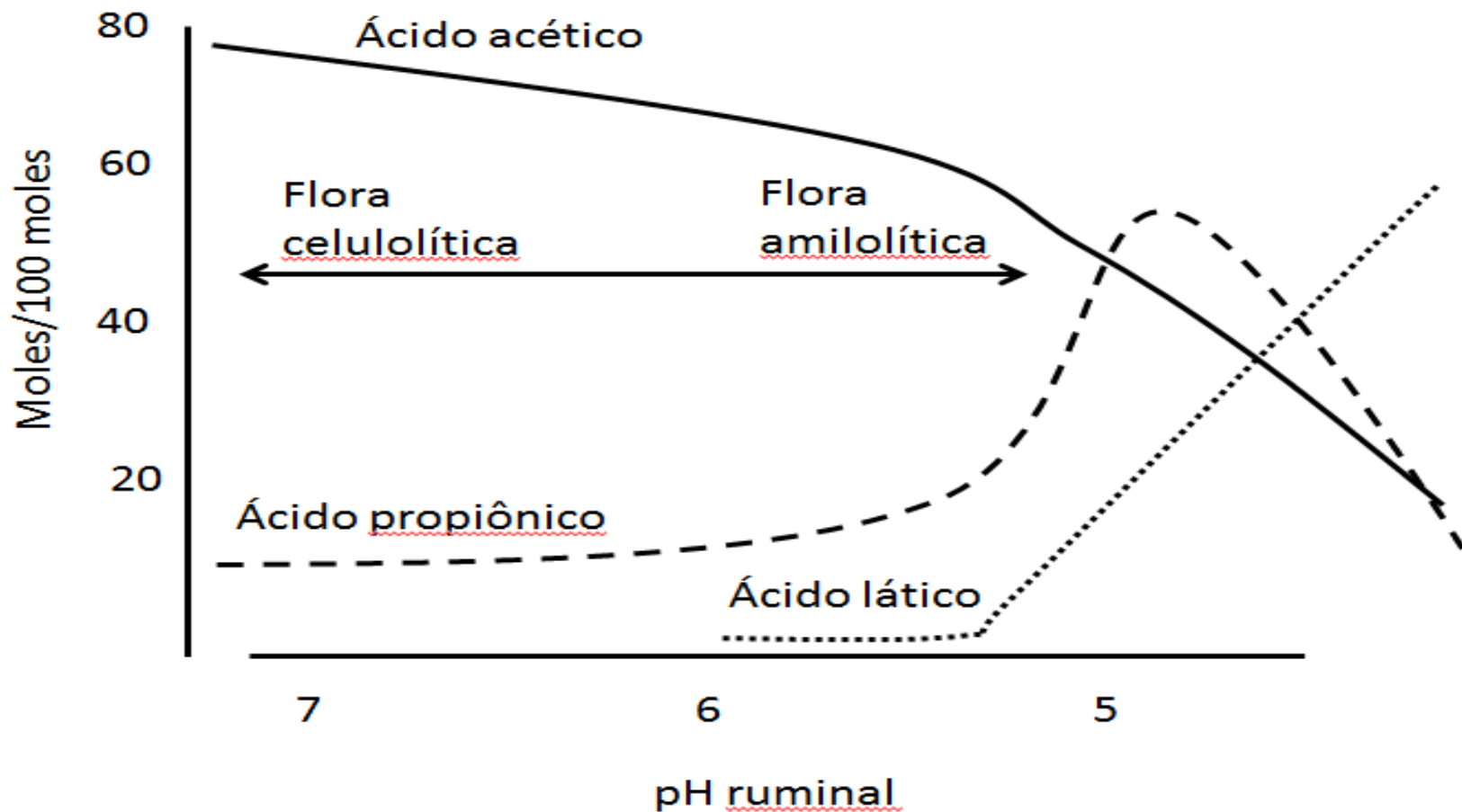
Alterações da
Microbiota



Doenças



Acidose Ruminal



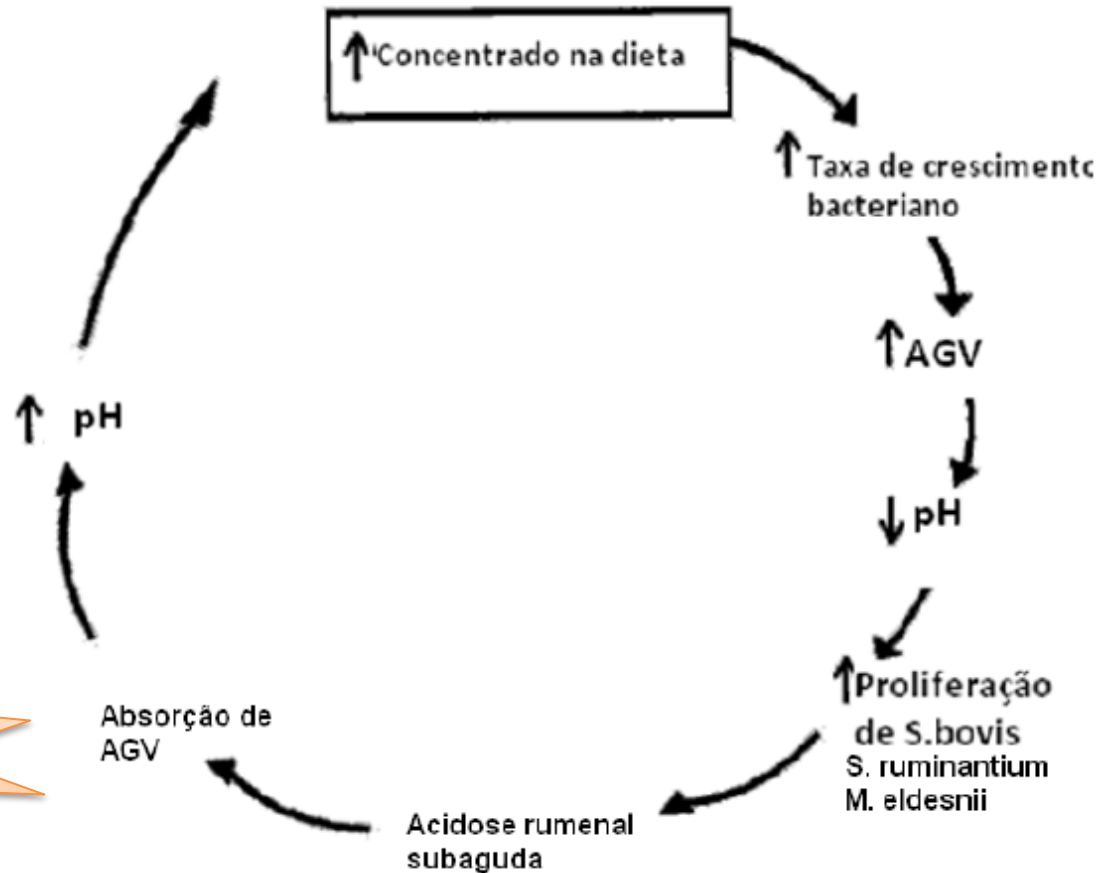
Acidose Ruminal

ACIDOSE SUBAGUDA

pH: 5,5 a 5,8

Temporária

Sem sinais
clínicos

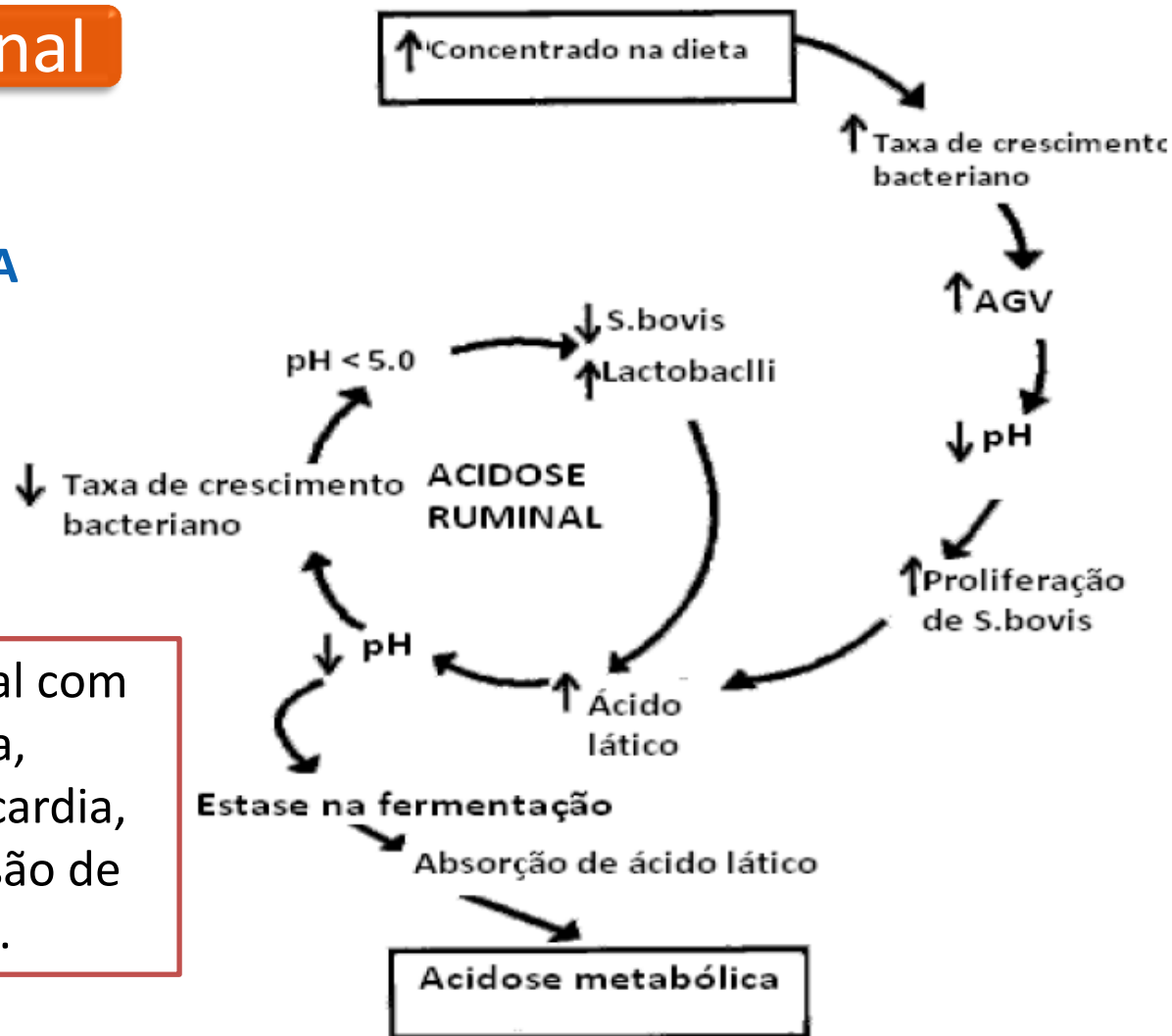


Acidose Ruminal

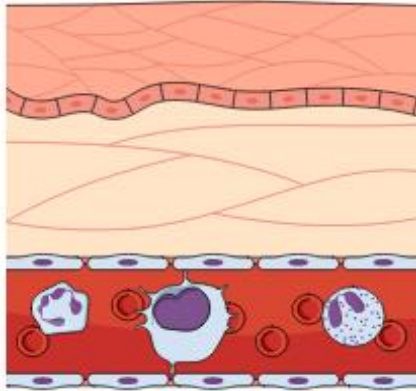
ACIDOSE AGUDA

pH < 5,5

Distensão abdominal com líquido, diarreia, desidratação, taquicardia, taquipnéia, depressão de estado mental.



Hematopoiese



CÉLULA TRONCO

PROGENITOR PLURIPOTENTE

PROGENITOR LINFÓIDE

PROGENITOR MIELÓIDE

ERITRÓCITO

Glóbulos Brancos

LINFÓCITO T

LINFÓCITO B

MONÓCITO

NEUTRÓFILO

EOSINÓFILO

BASÓFILO

PLAQUETAS

Glóbulos Vermelhos



Imunidade Inata



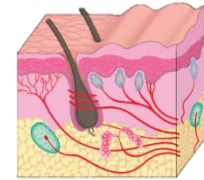
- ✓ Rápida
- ✓ Não específica
- ✓ Limitada

Barreiras Físicas e Mecânicas

Barreiras Fisiológicas

Barreira Inflamatória

Barreiras Celulares

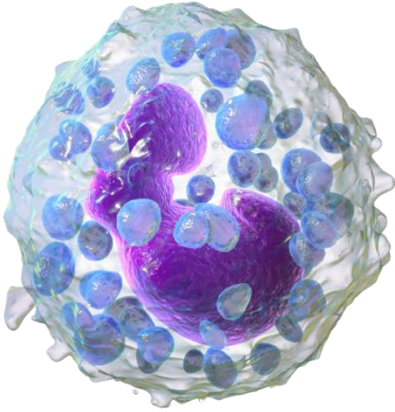


pH



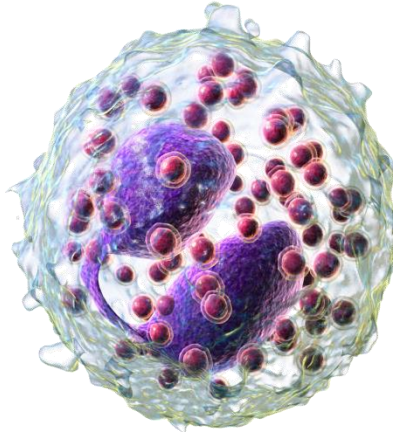
**Sem
memória**





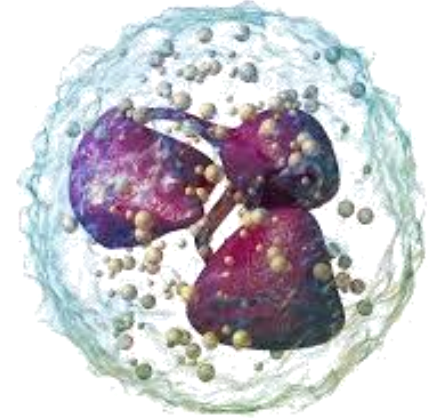
Basófilos

- ✓ Hipersensibilidade imediata
- ✓ Produzem histamina e heparina



Eosinófilos

Infecções
por
parasitas



Neutrófilos

Infecção
Bacteriana



Imunidade Adaptativa

Contato com agentes infecciosos

Resposta aumenta a cada exposição sucessiva

- ✓ Especificidade
- ✓ Diversidade
- ✓ Especialização
- ✓ Discriminação e auto-tolerância
- ✓ Auto-limitação da resposta

Com memória

Humoral

Anticorpos

- ✓ Microrganismos extracelulares
- ✓ Toxinas

Ativa

Exposição

Celular

Destruição

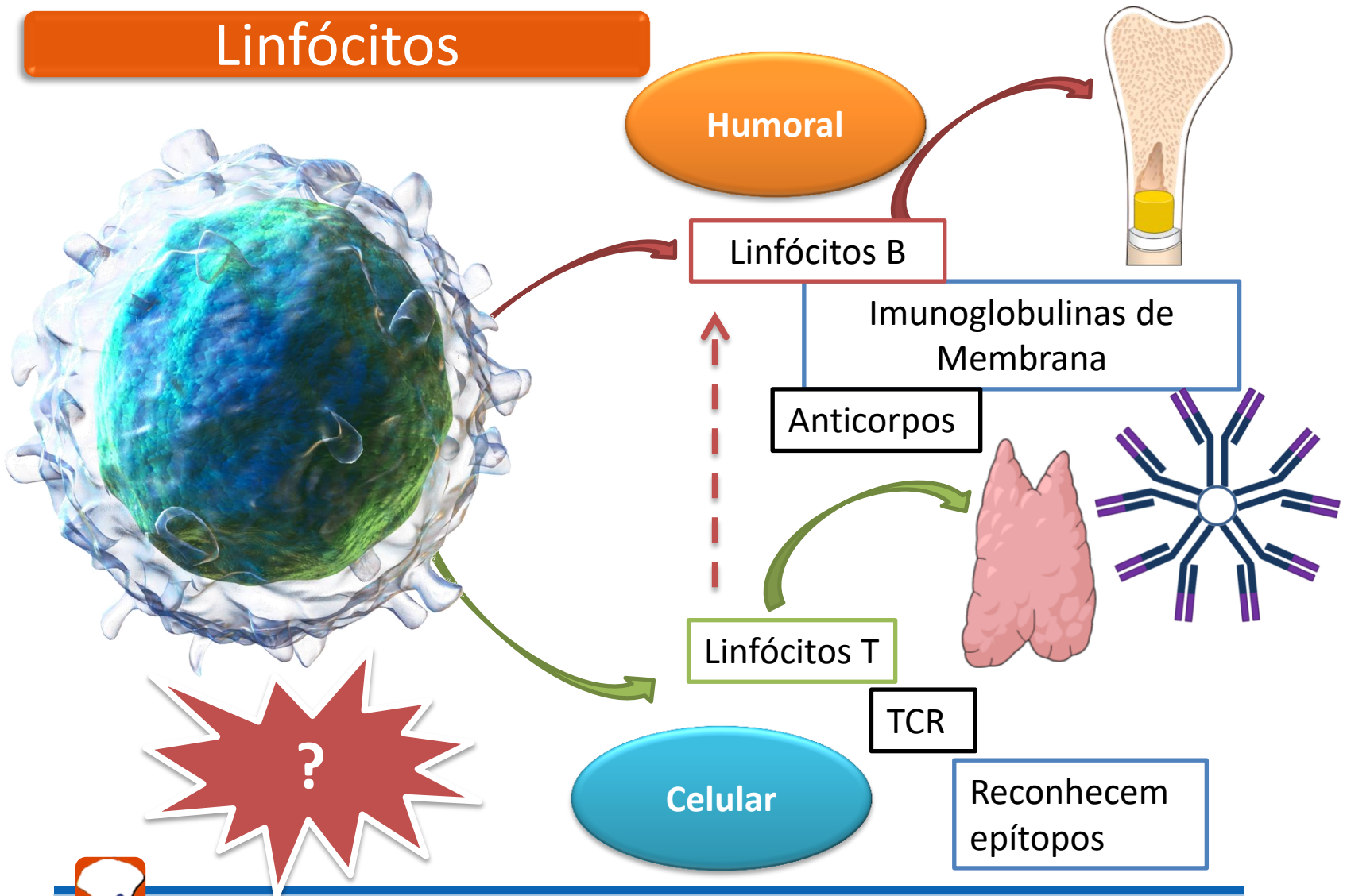
- ✓ Microrganismos intracelulares (vírus, bactérias)

Passiva

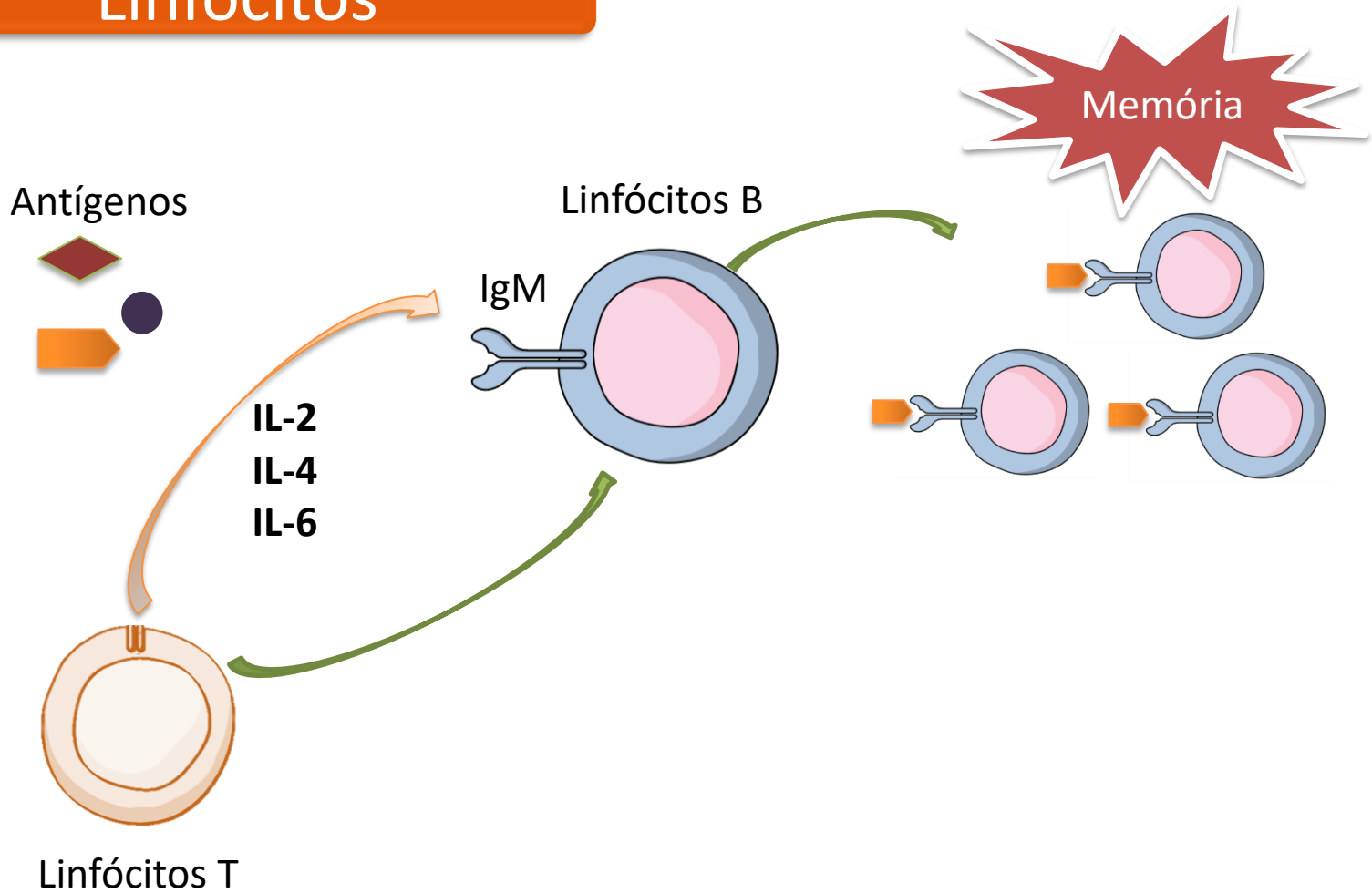
Transferência



Linfócitos



Linfócitos



Linfócitos T

T Helper ou
CD4



Auxilia ativando
as outras células
para geração da
resposta imune

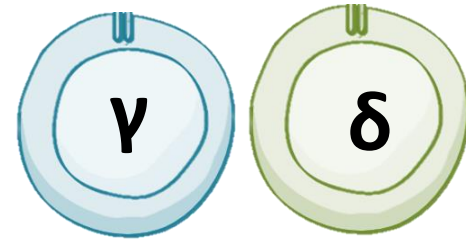
CD8



Citotóxico



Morte da célula
infectada



MALT





Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc



Resposta Imune Inata gerada a partir do estresse metabólico pode ser detectada em fluídos do rúmen



Erminio Trevisi^a, Federica Riva^{b,*}, Joel Fernando Soares Filipe^b, Matteo Massara^{b,1},
Andrea Minuti^a, Paolo Bani^a, Massimo Amadori^c

^a Istituto di Zootecnica, Facoltà di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Università Cattolica del Sacro Cuore, via Emilia Parmense 84, 29122 Piacenza, Italy

^b Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano, Italy

^c Laboratory of Cellular Immunology, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italy

Fator de impacto: **1,616**



Objetivos

1º

Investigar o conteúdo de leucócitos na saliva de vacas leiteiras para avaliar sua contribuição na infiltração dessas células no líquido ruminal.

2º

Avaliar o perfil dos leucócitos e imunoglobulinas no rúmen e sua correlação com parâmetros bioquímicos, a fim de analisar a resposta imune inata como um possível diagnóstico para distúrbios metabólicos e digestórios.



Materiais e Métodos

Saliva



Fluídos Ruminais

Rumenocentese

6h após TMR

128 vacas

12 fazendas

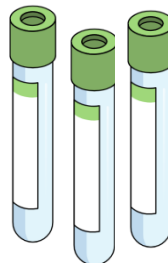
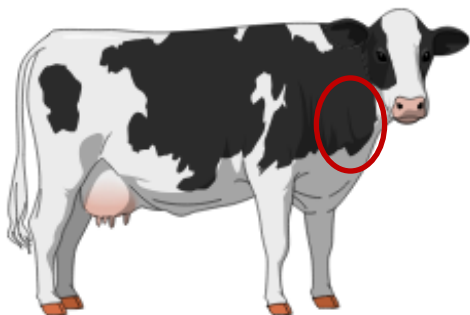
½ 30 a 90
dias em
lactação

½ 150 a 250
dias em
lactação

pH



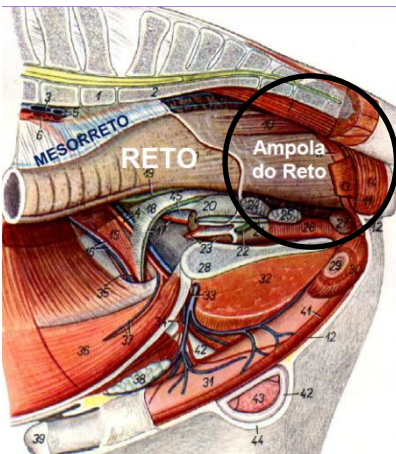
Materiais e Métodos



Determinação
do volume de
células e
análises



Amostras Fecais



pH e
AGV



CCS

ECC

Rendi
mento

Compo
sição



Materiais e Métodos

Leucócitos foram isolados

Citometria de Fluxo

Células da Saliva
e Líquido
Ruminal

Anticorpo monoclonal
CD45

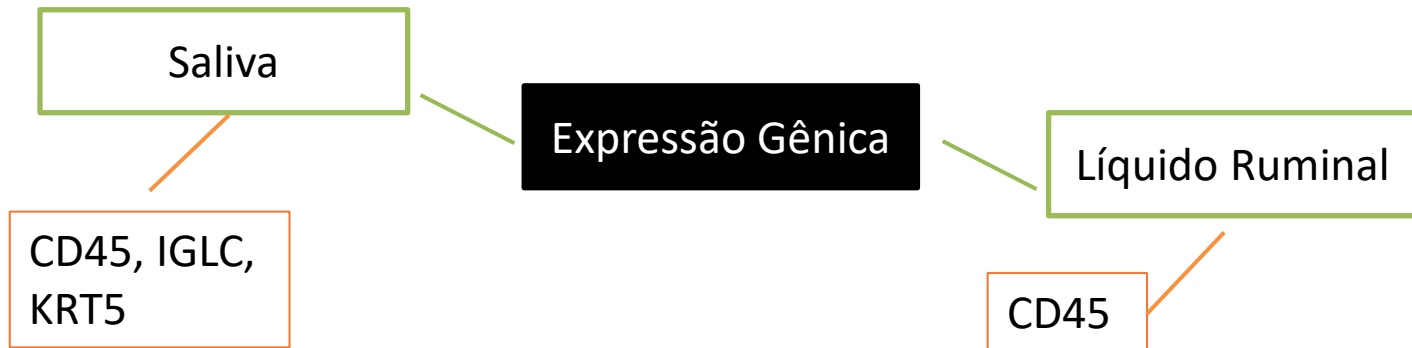
Leucócitos

CD45

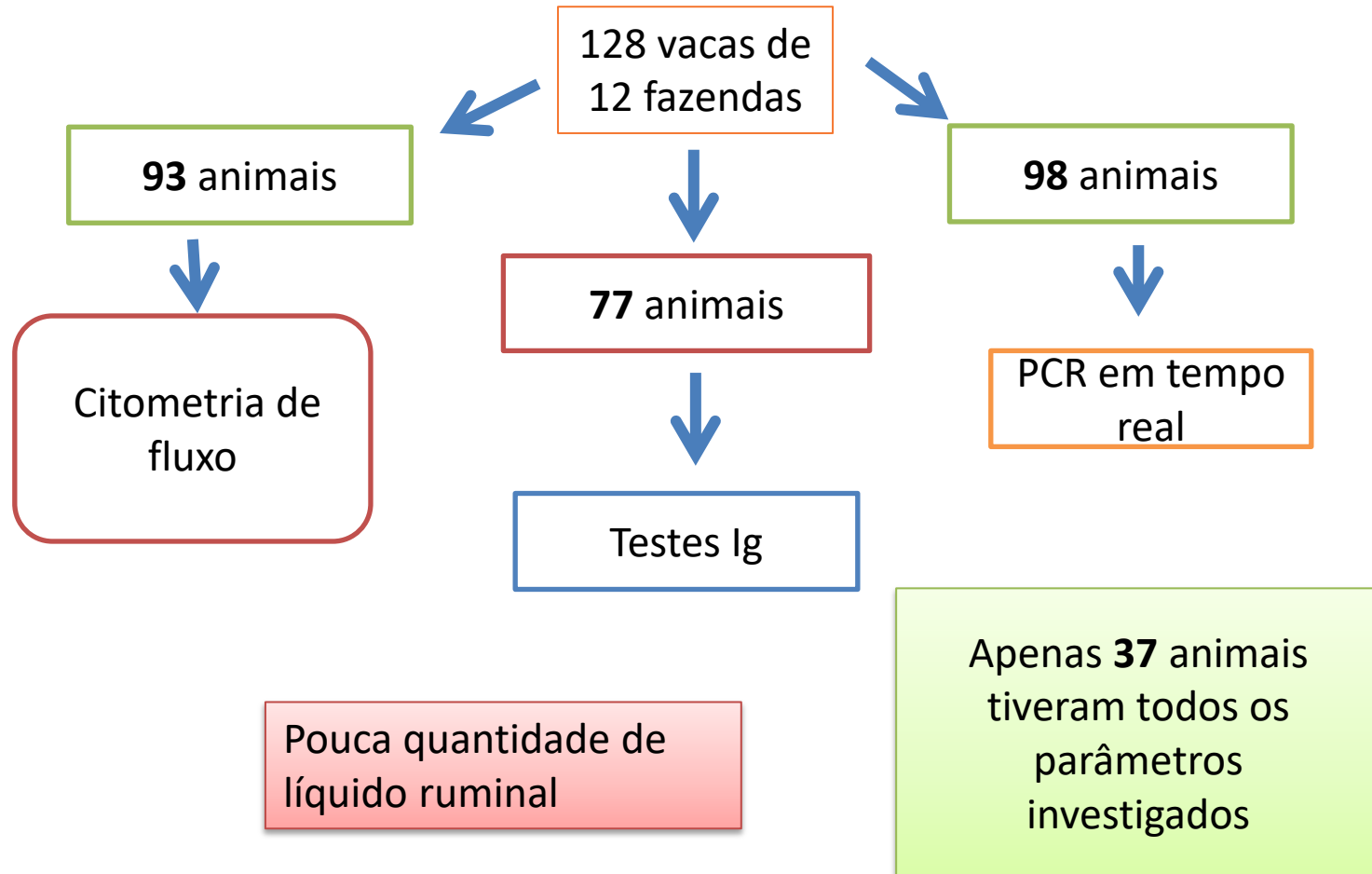


Materiais e Métodos

Extração do RNA, Transcrição Reversa e PCR em tempo real

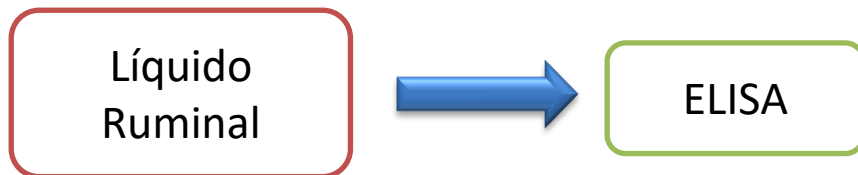


Materiais e Métodos



Materiais e Métodos

Imunoglobulinas totais e Imunoglobulinas de membrana



Ensaio inflamometabólicos



- ✓ Glicose
- ✓ Colesterol total
- ✓ Creatinina
- ✓ Ureia
- ✓ Aspartato aminotransferase (GOT)
- ✓ γ -glutamil transpeptidase (GGT)
- ✓ Fosfatase alcalina (ALT)
- ✓ NEFA
- ✓ BHBA



Materiais e Métodos

Ensaio inflamometabólicos

Minerais

- ✓ Ca
- ✓ P
- ✓ Mg
- ✓ K
- ✓ Na
- ✓ Cl
- ✓ Zn

Indicadores
oxidativo-
inflamatórios

- ✓ Proteína total
- ✓ Albumina
- ✓ Colesterol total
- ✓ Bilirrubina total
- ✓ Haptoglobina
- ✓ Ceruplasmina
- ✓ ROMs
- ✓ Paraoxanase
- ✓ NO₃
- ✓ NO₂
- ✓ NO_x



Materiais e Métodos

Análise Estatística

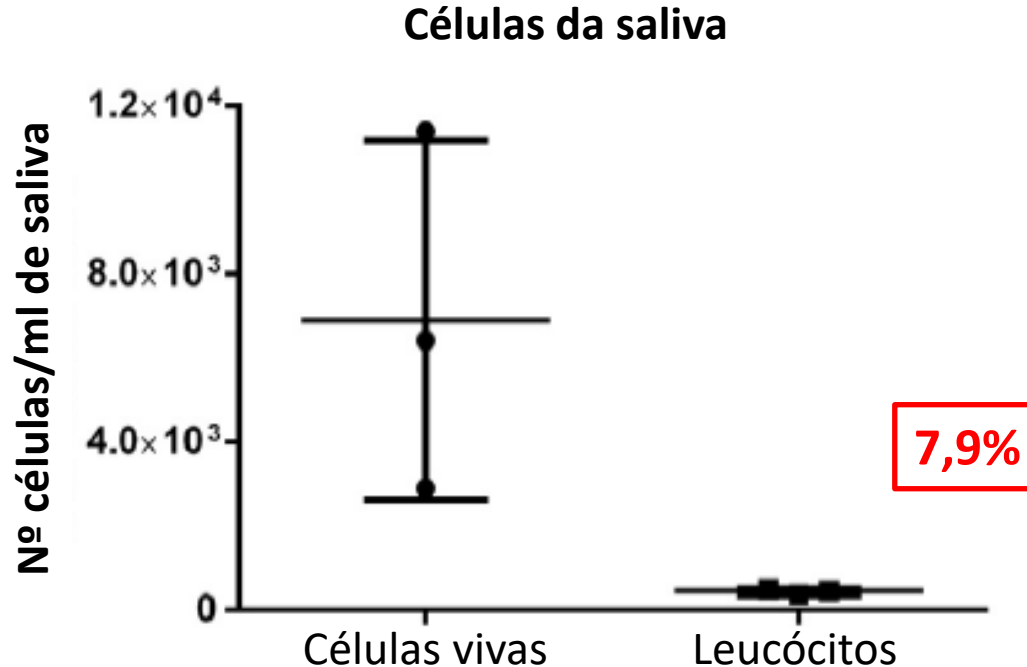
Teste de correlação de duas caudas não paramétrico de Spearman com $\alpha=0,05$

Tendência: $p<0,1$



Resultados e discussão

ORIGEM DOS LEUCÓCITOS – SALIVA

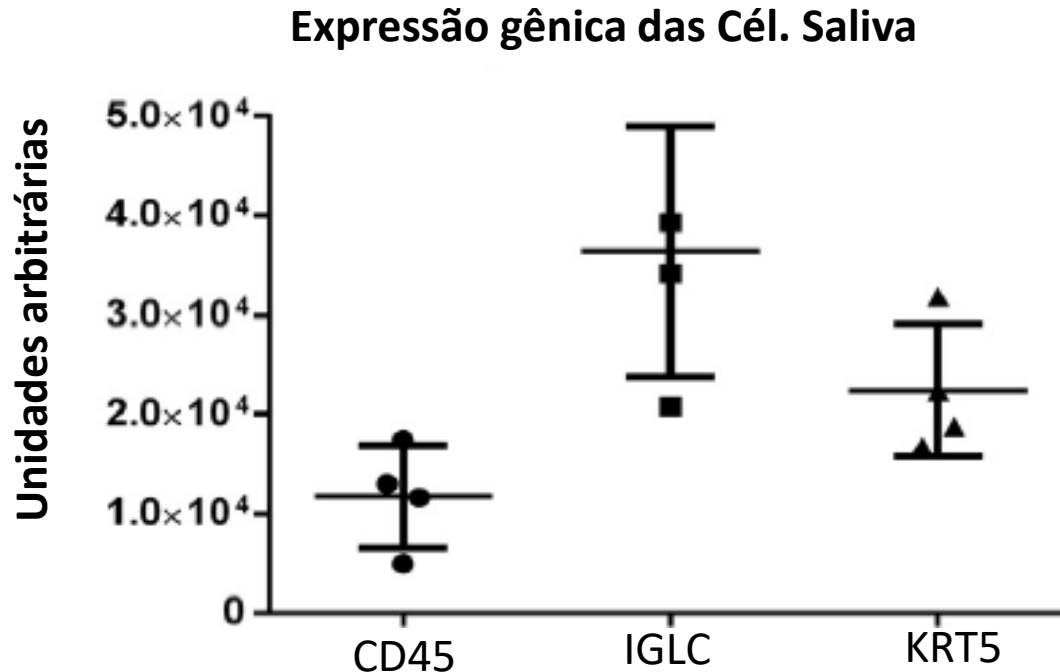


Média do número de células vivas totais de $6,9 \times 10^3$ com erro padrão entre $2,9 \times 10^3$ e 11×10^4 /mL e leucócitos de $4,48 \times 10^2$ com um erro entre $3,6 \times 10^2$ e $4,8 \times 10^2$ /mL.



Resultados e discussão

ORIGEM DOS LEUCÓCITOS – SALIVA



Expressão dos genes CD45 (leucócitos), IGLC (células B), KRT5 (células epiteliais).



Resultados e discussão

SAÚDE ANIMAL E NÍVEIS DE PRODUÇÃO

Todos animais clinicamente saudáveis

➡ pH ruminal: algumas fazendas com alguns animais com SARA



Resultados e discussão

SAÚDE ANIMAL E NÍVEIS DE PRODUÇÃO

CORRELAÇÃO:

SARA (pH<5,6) → Produção de leite e CCS ($P>0,05$)

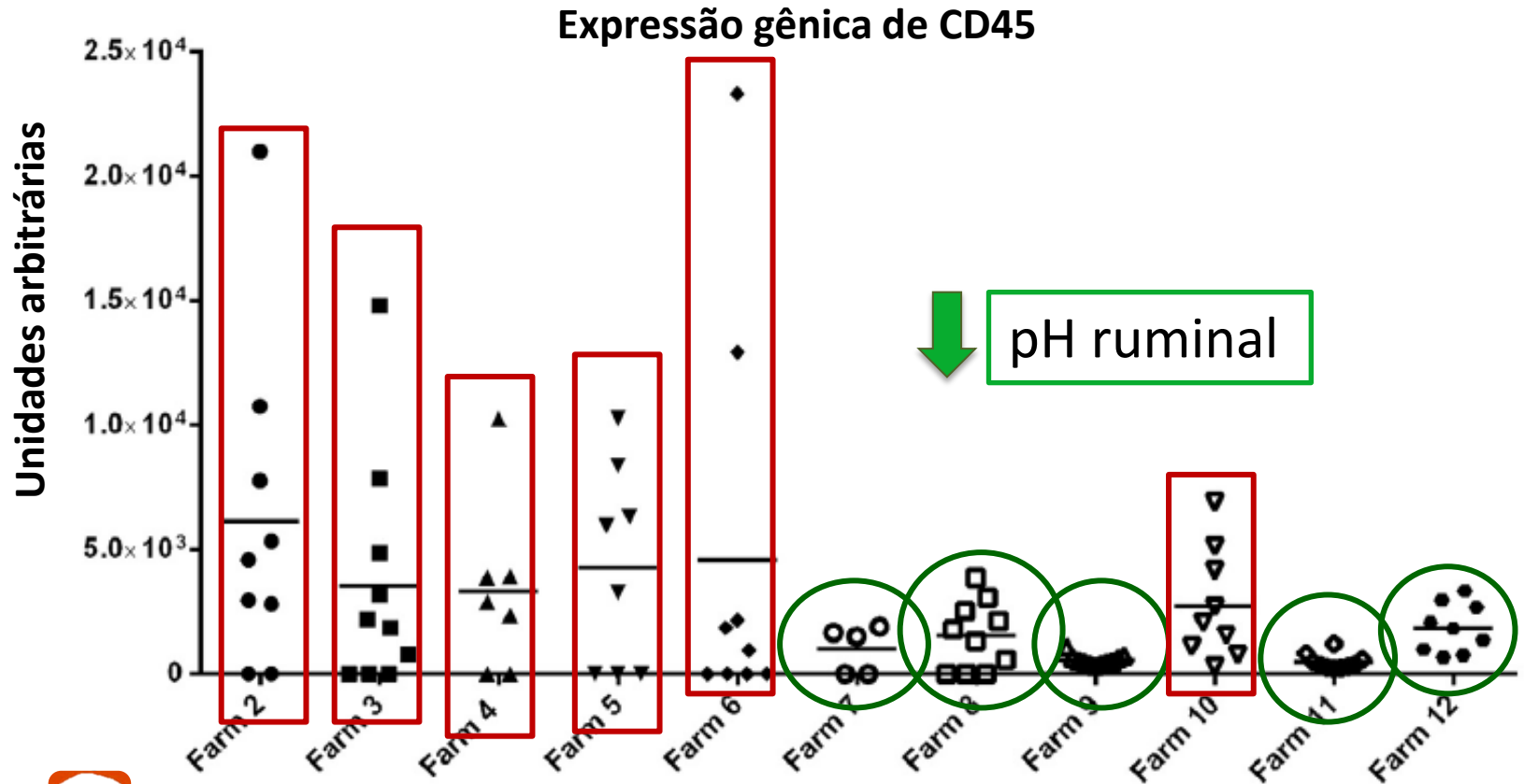
↓ pH médio da fazenda → AGV e produção de leite ($P<0,1$)

Zinco e colesterol ($P<0,05$)



Resultados e discussão

NÍVEIS DE LEUCÓCITOS NO LÍQUIDO RUMINAL



Resultados e discussão

NÍVEIS DE LEUCÓCITOS NO LÍQUIDO RUMINAL

Tabela - Correlação entre expressão gênica de CD45 e parâmetros bioquímicos e hematológicos

Parâmetros		Rho (Spearman) p	
Expressão gênica de CD45	RumenpH	0.27	0.0068**
	IL-A29 (gamma delta T cells)	0.29	0.024*
	IL-A24 (myeloid cells)	0.27	0.042*
	Total immunoglobulins in rumen fluid	0.36	0.0092**

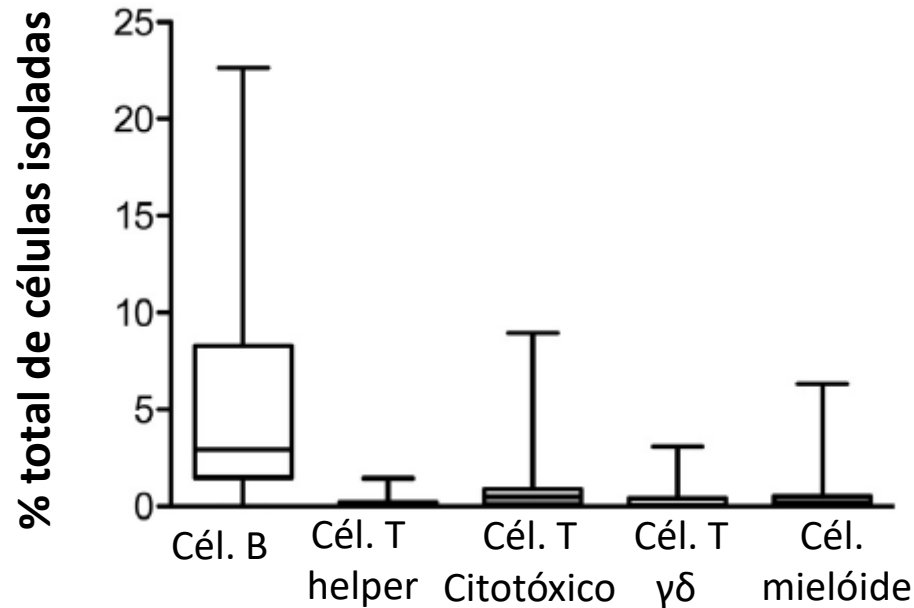
* $P < 0,05$

** $P < 0,01$



Resultados e discussão

FREQUÊNCIA DE CÉLULAS MONONUCLEARES NO LÍQUIDO RUMINAL



Porcentagem do perfil de leucócitos expressa em mediana



Resultados e discussão

Correlação entre leucócitos e parâmetros bioquímicos e hematológicos

LT Helper

Parâmetros		Rho (Spearman)	p
ILA12 (CD4 + cells)	ILA29 (gamma delta T cells)	0.48	< 0.0001 ^{**}
	ILA24 (myeloid cells)	0.50	< 0.0001 ^{**}

^{**}P<0,01



Resultados e discussão

Correlação entre leucócitos e parâmetros bioquímicos e hematológicos

LT $\gamma\delta$

	Parâmetros	Rho (Spearman)	p
ILA29 (gamma delta T cells)	Paraoxonase	0.37	0.0005 **
	ILA12 (CD4 + cells)	0.48	< 0.0001 **
	ILA24 (myeloid cells)	0.48	< 0.0001 **

**P<0,01



Resultados e discussão

Correlação entre leucócitos e parâmetros bioquímicos e hematológicos

LT citotóxico

Parâmetros		Rho (Spearman)	p
ILA51 (CD8 + cells)	IgMCD21 (mature B cells)	0.43	0.0002**

**P<0,01



Resultados e discussão

Correlação entre leucócitos e parâmetros bioquímicos e hematológicos

LB

	Parâmetros	Rho (Spearman)	p
ILA30 (B cells)	Fecal pH	0.40	< 0.0001 ^{**}
	Paraoxonase	- 0.44	< 0.0001 ^{**}

^{**}P<0,01



Resultados e discussão

Correlação entre leucócitos e parâmetros bioquímicos e hematológicos

Células mielóides

	Parâmetros	Rho (Spearman)	p
ILA24 (myeloid cells)	Bilirubinemia	0.39	0.0002**
	ILA12 (CD4 + cells)	0.50	< 0.0001**
	ILA29 (gamma delta T cells)	0.48	< 0.0001**
	IgMCD21 (mature B cells)	0.44	0.0001**

**P<0,01



Resultados e discussão

Correlação entre imunoglobulinas e parâmetros bioquímicos e hematológicos

Imunoglobulina M

	Parâmetros	Rho (Spearman)	p
IgM in rumen fluid	Ruminal valeric acid	- 0.45	< 0.0001 **
	Ruminal volatile fatty acids	- 0.41	0.0004 **
	ME [§] (Mature equivalent milk production)	- 0.52	0.001 **
	Na	0.47	< 0.0001 **
	Total immunoglobulins in rumen fluid	0.60	< 0.0001 **
**P<0,01			



Resultados e discussão

Correlação entre imunoglobulinas e parâmetros bioquímicos e hematológicos

Imunoglobulinas totais

Parâmetros		Rho (Spearman)	p
Total immunoglobulins in rumen fluid	Ruminal pH	0.43	0.0002**
	Basophils (number)	0.38	0.0009**
	Basophils (%)	0.39	0.0006**
	Hematic urea	0.49	< 0.0001**
	Na	0.43	0.0001**
	K	− 0.40	0.0004**
	Paraoxonase	− 0.39	0.0005**
	IgM in rumen fluid	0.60	< 0.0001**

**P<0,01



**VOCÊS UTILIZARIAM O PERFIL DE LEUCÓCITOS
COMO DIAGNÓSTICO PARA SARA?**

SIM

NÃO

Conclusão

A resposta imune gerada no rúmen pode indicar transtornos;

Marcadores imunológicos a nível ruminal podem integrar os parâmetros de diagnóstico;

Contribuição para o diagnóstico robusto de problemas digestórios em ruminantes.





FACULDADE DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICAS VETERINÁRIA
www.ufpel.edu.br/nupeec



OBRIGADA!!!!