

## Viabilidade celular, fagocitose e espraçamento de fagócitos mononucleares, e liberação de peróxido de hidrogênio por leucócitos de glândulas mamárias bovinas saudáveis e infectadas<sup>1</sup>

Camila R. Bastos<sup>2</sup>, Maiara G. Blagitz<sup>3</sup>, Fernando N. Souza<sup>4</sup>, Camila F. Batista<sup>2</sup>,  
Claudia R. Stricagnolo<sup>2</sup>, Milton R. Azedo<sup>5</sup> e Alice M.M.P. Della Libera<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.**- Bastos C.R., Blagitz M.G., Souza F.N., Batista C.F., Stricagnolo C.R., Azedo M.R. & Della Libera A.M.M.P. 2012. [Cell viability, phagocytosis and spreading by mononuclear phagocytes and hydrogen peroxide release by leukocytes from healthy and infected bovine mammary glands.] Viabilidade celular, fagocitose e espraçamento de fagócitos mononucleares e liberação de peróxido de hidrogênio por leucócitos de glândulas mamárias bovinas saudáveis e infectadas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(9):850-854. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brazil. E-mail: [dellalibera@usp.br](mailto:dellalibera@usp.br)

The study aimed to evaluate the cell viability, the phagocytosis and spreading rates by the mononuclear phagocytes, and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) release by leukocytes from healthy and infected mammary glands. Thus, 94 milk samples were divided according the results of the bacteriological analysis and the somatic cell count (SCC). No significant difference was found in cell viability, the phagocytosis and spreading rates by mononuclear phagocytes between the distinct groups. Therefore, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by leukocytes was higher in the milk samples from healthy mammary glands compared to those infected with *Streptococcus* spp. or *Corynebacterium* spp. However, when the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by phagocytes in 1mL of milk according to SCC mL<sup>-1</sup> of each sample was estimated, it was found that milk samples from infected, infected with *Staphylococcus* spp. and bacteriological negative quarters with high SCC were higher than the healthy ones. It was also observed a positive correlation among SCC and cell viability or phagocytosis and spreading rates, and a negative correlation between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release and cell viability or SCC. In face of, it can be concluded that the SCC, as well as their function and the cell viability, are related to mammary gland health.

INDEX TERMS: Immune response, macrophages, mastitis, milk.

<sup>1</sup> Recebido em 31 de janeiro de 2012.

Aceito para publicação em 24 de maio de 2012.

Parte integrante da dissertação da primeira autora, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP).

<sup>2</sup> Departamento de Clínica Médica, FMVZ-USP, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brazil.

\*Autor para correspondência: [dellalibera@usp.br](mailto:dellalibera@usp.br)

<sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, Rua Pioneiro 2153, Jardim Dallas, Palotina, PR 85950-000, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 30123-970, Brasil.

<sup>5</sup> Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Metropolitana de Santos, Av. Antônio Manuel de Carvalho 3935, Santos, SP 11080-300, Brasil.

**RESUMO.**- O presente estudo objetivou avaliar a viabilidade celular, a capacidade de fagocitose e espraçamento pelos fagócitos mononucleares, e a liberação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por leucócitos oriundos de glândulas mamárias bovinas saudáveis e infectadas. Deste modo, 94 amostras foram divididas de acordo com os resultados da cultura bacteriológica e da contagem de células somáticas (CCS). O presente estudo não encontrou diferenças na viabilidade celular, e nos índices de fagocitose e espraçamento entre os diferentes grupos. No entanto, a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oriundos dos quartos mamários infectados, infectados por *Streptococcus* spp. ou *Corynebacterium* spp. foi menor do que nas amostras de leite provenientes dos quartos mamários saudáveis. Ao estimar a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup> leite

observou-se que as amostras de quartos mamários positivos no exame bacteriológico, infectados por *Staphylococcus* spp. e negativos no exame bacteriológico com alta celularidade foram maiores que aquelas provenientes de quartos mamários saudáveis. Observou-se também correlação positiva entre a CCS e a viabilidade celular e os índices de fagocitose e espraio; e correlação negativa entre a liberação de  $H_2O_2$  e a CCS e a viabilidade celular. Concluiu-se que a CCS, assim como a sua viabilidade e função, são conceitos intimamente relacionados com a saúde da glândula mamária.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leite, macrófagos, mastite, resposta imune.

## INTRODUÇÃO

Apesar das ferramentas disponíveis para o monitoramento e controle da mastite, esta enfermidade continua sendo uma das principais causas de perdas econômicas à atividade leiteira. Desta forma, a melhor compreensão dos mecanismos de defesa da glândula mamária permitiria a adoção de medidas profiláticas e terapêuticas mais adequadas para obtenção de êxito no que diz respeito à sanidade da glândula mamária (Souza et al. 2012).

As defesas celulares inatas são representadas pelos neutrófilos, macrófagos, células epiteliais e células *Natural killer*. Os macrófagos, que representam os fagócitos mononucleares, podem desempenhar várias funções na defesa do tecido mamário, como a fagocitose, apresentação de antígenos para linfócitos T, participação na produção e secreção de diversos fatores biologicamente importantes, como a lactoferrina, fatores do sistema complemento, N-acetil- $\beta$ -D-glucosamidase, citocinas e componentes derivados do ácido aracônico; e ainda apresentam crucial relevância na remoção de detritos teciduais, e até mesmo na remoção de neutrófilos apoptóticos, minimizando a liberação de seu conteúdo granular que é tóxico ao tecido mamário (Johnston 1988, Carneiro et al. 2009), sendo a principal população celular presente no leite de bovinos saudáveis (Sarıkaya et al. 2004).

Atribui-se aos leucócitos polimorfonucleares (PMNL) a maior responsabilidade na proteção da glândula mamária aos patógenos invasores (Paape et al. 2003, Elazar et al. 2010, Souza et al. 2012). Entretanto, deve-se considerar a delicada inter-relação que rege os mecanismos imunes, e o papel crucial dos macrófagos na detecção e montagem da resposta imune, e conseqüentemente nos mecanismos de defesa da glândula mamária (Della Libera et al. 2006).

Sabe-se que a capacidade funcional de fagócitos envolvidos na resposta imune pode ser avaliada, em parte, pela competência destas células de englobar e lisar partículas ou microorganismos, pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), entre elas o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ou até mesmo, pela capacidade de aderir e emitir microvilos, manifestada pela aderência e espraio de fagócitos mononucleares em lâmina de vidro (Della Libera et al. 2006, Azedo et al. 2011). Neste ínterim, pode-se dizer que avaliar funcionalmente os fagócitos torna possível identificar interações que o mecanismo mais trivial de defesa da glândula mamária - os mecanismos de defesa celular -

pode vir a sofrer, quer por influências da dieta, de estresse, mas principalmente pelo processo inflamatório (IDF 2003).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade celular, a capacidade de fagocitose e espraio de fagócitos mononucleares, e a liberação de peróxido de hidrogênio por leucócitos oriundos de glândulas mamárias bovinas saudáveis e infectadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 94 amostras de leite proveniente de glândulas mamárias de vacas em diferentes fases da lactação, que foram divididas de acordo com os resultados da cultura bacteriológica e a CCS. As glândulas mamárias foram consideradas infectadas quando foi isolado pelo menos um agente causador de mastite no exame bacteriológico. Os quartos mamários negativos no exame bacteriológico foram divididas em dois grupos experimentais, o primeiro com baixa celularidade ( $\leq 200.000$  células/mL), quartos mamários que foram considerados como saudáveis conforme previamente estabelecido por Schukken et al. (2003), e o segundo grupo foi formado por quartos mamários negativos no exame bacteriológico, mas com alta CCS ( $> 200.000$  células/mL).

Inicialmente, coletaram-se asepticamente as amostras de leite para o exame bacteriológico, CCS, e para avaliação da viabilidade celular, fagocitose e espraio pelos fagócitos mononucleares, e liberação de  $H_2O_2$  pelos leucócitos. A CCS foi realizada no aparelho Somacount 300 (Bentley Instruments®, Chaska, EUA). O exame bacteriológico foi realizado pela cultura de 0,01mL de leite estriado em ágar-sangue de carneiro (5%) com incubação a 37°C por 72 horas e a leitura realizada a cada 24 horas, como recomendado por Oliver et al. (2004).

O isolamento das células do leite foi realizado conforme descrito por Della Libera et al. (2006), no qual foram coletados 500mL de leite de cada quarto mamário juntamente com 500mL de solução salina tamponada. Após o isolamento, procedeu-se a avaliação da viabilidade celular com o azul de tripan (Jain & Jasper, 1967), buscando-se concentração de  $2 \times 10^6$  células viáveis  $mL^{-1}$ . Essa suspensão celular foi utilizada para as provas de fagocitose, espraio e liberação de  $H_2O_2$ .

As avaliações dos ensaios de fagocitose e espraio foram realizadas conforme previamente descrito por Della Libera et al. (2006) e Azedo et al. (2011). Inicialmente, procedeu-se o isolamento dos fagócitos mononucleares por aderência em lâmina de vidro, e posteriormente os índices de fagocitose e espraio desta população celular foram determinados, onde utilizaram-se quatro poços por amostra, sendo dois poços para avaliação da fagocitose e dois poços para avaliação do espraio. Sobre as lâminas foram depositados  $4 \times 10^5$  células viáveis  $mL^{-1}$ , que foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Para o ensaio de fagocitose, utilizou-se 1 $\mu$ L de parede de células mortas de *Saccharomyces cerevisiae* (Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma Aldrich, St Louis, USA, nº cat. Z4250), que foram incubadas por uma hora a 37°C. A função fagocítica e de espraio foi realizada por leitura em microscopia de contraste de fase (Fig.1), após duas lavagens com RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA, nº cat. R7638) e fixação com glutaraldeído a 0,5% durante 10 minutos, onde os valores percentuais dos fagócitos mononucleares que espraíram e que fagocitaram *S. cerevisiae* foram determinados.

As células para a determinação da liberação de  $H_2O_2$  foram ressuspendidas em 1mL de solução de vermelho fenol (SFV) (Sigma Aldrich, EUA). A mensuração da liberação de  $H_2O_2$  baseou-se na oxidação da SFV dependente de peroxidase, e foi realizado segundo método colorimétrico descrito por Pick & Keisari (1980),

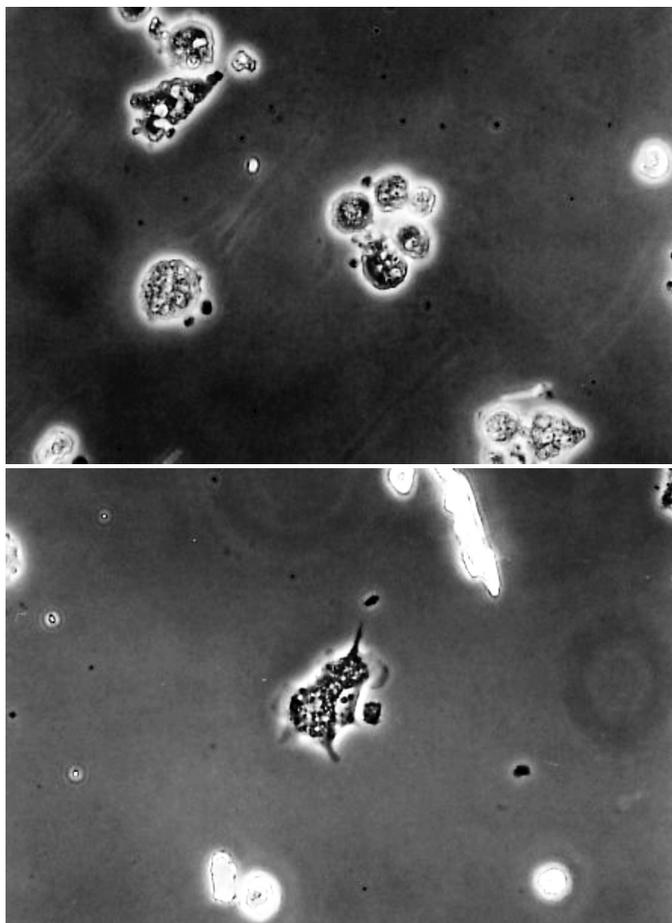


Fig.1. Fagócitos mononucleares do leite contendo parede de células mortas de *Saccharomyces cerevisiae* no seu interior (fagocitose), à esquerda, e fagócito mononuclear do leite espreado, à direita, em microscopia de contraste de fase. Aumento 600x.

adaptado para microensaio por Pick & Mizel (1981), e modificado por Della Libera et al. (2006). As amostras sem estímulo e estimuladas por 10ng mL<sup>-1</sup> de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma Aldrich, St Louis, EUA) e as soluções padrões (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/100µL da SFV) foram realizadas em quadruplicatas. A placa foi incubada por uma hora a 37°C, em câmara úmida, e após este período a reação foi bloqueada pela adição de

10µL de solução normal de NaOH, e a absorbância determinada a 620nm. O resultado foi expresso em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/4x10<sup>5</sup> células viáveis.

Portanto, com o intuito de estimar a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultante da liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos leucócitos em 1mL de leite ([H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] mL<sup>-1</sup> leite) considerando a celularidade de cada amostra, o seguinte cálculo foi aplicado:

$$[H_2O_2]/mL \text{ leite} = \frac{CCS \text{ mL}^{-1}}{(4 \times 10^5 / \% \text{ células viáveis})} \times \text{nmoles de } H_2O_2$$

Para a análise dos resultados, foi verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados da CCS foram transformados em escala logarítmica, pois não apresentaram distribuição normal. Para os dados com distribuição não paramétrica, o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's foi aplicado. Os dados paramétricos foram analisados pela ANOVA seguido pelo teste de Tukey-Kramer para comparações entre as médias. As correlações foram determinadas pelo coeficiente de correlação de Spearmann. A análise estatística foi realizada utilizando os programas BioEstat 5.0 (Belém, Brasil) e GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad software, Inc., San Diego, EUA). O nível de significância adotado foi de 5%.

## RESULTADOS

No presente estudo, 66 (70,21%) das 94 amostras de leite analisadas foram positivas no exame bacteriológico. Destas amostras, em 33 (50,00%) foram isoladas bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., em 23 (34,85%) foram isoladas *Corynebacterium* spp., em 7 (10,61%) foram isoladas *Streptococcus* spp., em 2 (3,03%) foram isoladas *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., e em 1 (1,52%) amostra foi isolada *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Dentre as 28 amostras negativas no exame bacteriológico, 20 (71,43%) e 8 (28,57%) amostras apresentaram baixa ( $\leq 2 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>) e alta celularidade ( $> 2 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>). No presente estudo, a CCS foi menor nos quartos considerados sadios, quando comparado com os quartos negativos ( $P < 0,0001$ ), embora a viabilidade celular ( $P = 0,50$ ) e os índices de fagocitose ( $P = 0,18$ ) e espraçamento ( $P = 0,16$ ) não diferiram entre os grupos (Quadro 1).

A liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos leucócitos foi menor nas amostras provenientes de quartos mamários positivos no exame

**Quadro 1. Média (±desvio-padrão) da CCS, da viabilidade celular, dos índices de fagocitose e espraçamento dos fagócitos mononucleares, e da liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em nmoles, sem estímulo e estimuladas por PMA pelos fagócitos, assim como a [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] mL<sup>-1</sup> no leite estimuladas ou não por PMA nos quartos mamários considerados sadios (n=20), negativos no exame bacteriológico com alta CCS ( $> 2 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>) (n=8), positivos no exame bacteriológico (n=66), infectados por *Staphylococcus* spp. (n=33), *Streptococcus* spp. (n=7) e *Corynebacterium* spp. (n=23)**

Variável/Grupo	Sadios	Negativos com alta CCS	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> spp.	Infectados
Log CCS	1,33 ± 0,61 <sup>a</sup>	3,10 ± 0,62 <sup>b</sup>	2,59 ± 0,93 <sup>b</sup>	3,00 ± 0,40 <sup>b</sup>	2,56 ± 0,78 <sup>b</sup>	2,64 ± 0,82 <sup>b</sup>
% Células viáveis	62,98 ± 17,56 <sup>a</sup>	68,46 ± 19,76 <sup>a</sup>	67,66 ± 19,27 <sup>a</sup>	71,92 ± 20,16 <sup>a</sup>	72,71 ± 17,81 <sup>a</sup>	70,57 ± 18,73 <sup>a</sup>
% Fagocitose	52,21 ± 21,43 <sup>a</sup>	65,40 ± 23,68 <sup>a</sup>	58,50 ± 20,68 <sup>a</sup>	67,46 ± 14,46 <sup>a</sup>	65,02 ± 14,13 <sup>a</sup>	62,44 ± 17,84 <sup>a</sup>
% Espraçamento	68,88 ± 18,50 <sup>a</sup>	80,65 ± 16,17 <sup>a</sup>	72,53 ± 18,17 <sup>a</sup>	84,25 ± 4,30 <sup>a</sup>	79,23 ± 8,94 <sup>a</sup>	76,83 ± 14,66 <sup>a</sup>
Liberação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	21,16 ± 22,52 <sup>b</sup>	14,05 ± 19,33 <sup>ab</sup>	18,77 ± 25,13 <sup>ab</sup>	3,81 ± 3,54 <sup>a</sup>	6,80 ± 7,34 <sup>a</sup>	12,35 ± 19,32 <sup>a</sup>
Liberação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> estimuladas por PMA	22,09 ± 23,16 <sup>b</sup>	19,16 ± 23,48 <sup>ab</sup>	19,85 ± 22,20 <sup>ab</sup>	3,48 ± 4,02 <sup>a</sup>	7,91 ± 5,33 <sup>ab</sup>	13,24 ± 17,32 <sup>ab</sup>
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] mL <sup>-1</sup> de leite	0,46x10 <sup>-2</sup> ± 0,81x10 <sup>-2a</sup>	12,64x10 <sup>-2</sup> ± 18,00x10 <sup>-2b</sup>	7,29x10 <sup>-2</sup> ± 16,54x10 <sup>-2b</sup>	2,33x10 <sup>-2</sup> ± 3,37x10 <sup>-2ab</sup>	1,85x10 <sup>-2</sup> ± 2,27x10 <sup>-2ab</sup>	4,60x10 <sup>-2</sup> ± 12,04x10 <sup>-2b</sup>
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] mL <sup>-1</sup> de leite estimulados por PMA	0,45x10 <sup>-2</sup> ± 0,81x10 <sup>-2a</sup>	29,53x10 <sup>-2</sup> ± 56,94x10 <sup>-2b</sup>	7,84x10 <sup>-2</sup> ± 18,20x10 <sup>-2b</sup>	1,93x10 <sup>-2</sup> ± 2,62x10 <sup>-2ab</sup>	1,92x10 <sup>-2</sup> ± 2,75x10 <sup>-2ab</sup>	4,89x10 <sup>-2</sup> ± 13,24x10 <sup>-2b</sup>

Letras diferentes indicam  $P \leq 0,05$ ; CCS = contagem de células somáticas; PMA = forbol 12-miristato 13-acetato; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = concentração de peróxido de hidrogênio.

bacteriológico, infectados por *Streptococcus* spp. e infectados por *Corynebacterium* spp. quando comparadas com os quartos mamários considerados sadios ( $P=0,01$ ) (Tab. 1). No entanto, a liberao de  $H_2O_2$  estimuladas por PMA pelos leucócitos provenientes de quartos mamários considerados sadios foi maior apenas que os quartos mamários infectados por *Streptococcus* spp. ( $P=0,02$ ) (Quadro 1).

Ao estimar a  $[H_2O_2]$   $mL^{-1}$  leite sem estímulo e estimulada por PMA produzida pelos leucócitos observou-se que as amostras provenientes de quartos mamários positivos no exame bacteriológico, infectados por *Staphylococcus* spp. e negativos no exame bacteriológico com alta celularidade foram maiores que as amostras provenientes de quartos mamários considerados sadios ( $P=0,003$ ;  $P=0,0006$ ) (Quadro 1).

Além disso, observou correlaao entre a CCS e a viabilidade celular ( $r=0,36$ ;  $P=0,0003$ ), os índices de fagocitose ( $r=0,32$ ;  $P=0,0015$ ) e espraio ( $r=0,32$ ;  $P=0,017$ ) pelos fagócitos mononucleares, e a liberao de  $H_2O_2$  sem estímulo ( $r=-0,34$ ;  $P=0,0007$ ) e estimuladas por PMA ( $r=-0,40$ ;  $P\leq 0,0001$ ) pelos leucócitos. Encontrou-se também correlaao entre a viabilidade e a liberao de  $H_2O_2$  sem estímulo ( $r=-0,37$ ;  $P=0,009$ ) e estimuladas por PMA ( $r=-0,20$ ;  $P=0,048$ ), embora não observou-se correlaao significativa entre a viabilidade celular e os índices de fagocitose ( $r=0,08$ ;  $P=0,43$ ) e espraio ( $r=0,04$ ;  $P=0,67$ ) pelos fagócitos mononucleares.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, apenas as bactérias dos gêneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. foram isoladas; estas bactérias são isoladas com mais frequência de casos de mastite infecciosa em bovinos (Souza et al. 2009, Della Libera et al. 2011, Langoni et al. 2011, Oliveira et al. 2011). Ademais, as glândulas mamárias consideradas sadias apresentaram menor celularidade no leite, já que o processo inflamatório leva a infiltrao de leucócitos para o sítio inflamatório na tentativa de eliminar os patógenos invasores (Della Libera et al. 2011).

Apesar de não ter sido evidenciada diferenaa entre as médias dos índices de viabilidade celular, fagocitose e espraio de fagócitos mononucleares, o presente estudo apontou para aumento da viabilidade celular, e dos índices de fagocitose e espraio de fagócitos mononucleares com o aumento da celularidade do leite. Sabe-se que durante o processo inflamatório, há significativo influxo de leucócitos para o sítio inflamatório, principalmente de neutrófilos (Paape et al. 2003), e em menor número macrófagos (Sladek & Rysanek 2010) e linfócitos (Riollet et al. 2001, Mehrzad et al. 2008), o que explicaria, pelo menos em parte a correlaao positiva entre a viabilidade celular e a CCS. Corroborando ao presente estudo, Pessoa et al. (2012) encontraram maior viabilidade de PMNL, assim como menor porcentagem de PMNL sofrendo apoptose, em amostras de leite com alta celularidade. Similarmente, Sladek & Rysanek (2010) observaram maior porcentagem de macrófagos residentes em apoptose que os macrófagos inflamatórios após induo de resposta inflamatória com

soluao salina tamponada ou lipopolisacárides em glândulas mamárias de novilhas clinicamente saudáveis.

A maior proporo de macrófagos inflamatórios após a induo de resposta inflamatória com soluao salina tamponada ou lipopolisacárides (Sladek & Rysanek 2010), pode explicar, pelo menos em parte, a correlaao positiva entre a CCS e os índices de fagocitose e espraio de fagócitos mononucleares. Sabe-se que a capacidade fagocítica dos macrófagos (Schroten et al. 1987, Johnston Jr. 1988), assim como dos PMNL (Paape et al. 2003, Mehrzad et al. 2009), podem apresentar reduzidas, devido a indiscriminada gestao de glóbulos de gordura, caseína e/ou debris celulares. Neste contexto, supoe-se que os macrófagos residentes presentes a maior tempo na glândula mamária apresentem menor capacidade fagocítica que os macrófagos inflamatórios que migraram recentemente para a glândula mamária.

Diferentemente do presente estudo, Mehrzad et al. (2004, 2005) encontraram maior produo de ERO pelos PMNL provenientes de glândulas mamárias experimentalmente infectadas por *Escherichia coli*. No entanto, estes autores utilizaram o ensaio de quimioluminescência do luminol, que mensura tanto a produo intracelular quanto a liberao de ERO (Rinaldi et al. 2007), o que pode explicar, em parte, a discrepância entre os resultados descritos e aqueles encontrados no presente estudo. Do mesmo modo, Rinaldi et al. (2008) encontraram maior produo intracelular de ERO pelos neutrófilos no dia do parto em vacas leiteiras, enquanto Gilbert et al. (1993) demonstraram menor liberao de ERO no período periparturiente, ao tentarem avaliar a capacidade microbicida desta populao celular. As ERO produzidas pelos PMNL, no ambiente extracelular, podem levar a danos teciduais e celulares, como a clivagem de proteínas, o que pode levar à amplificao do processo inflamatório e a maior migrao de PMNL para a glândula mamária (Blagitz et al. 2011, Pessoa et al. 2012). Congruente a isso, Niethammer et al. (2009) demonstraram a importância do  $H_2O_2$  no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório, mesmo em condições assépticas. Assim, a maior  $[H_2O_2]$   $mL^{-1}$  leite nas glândulas mamárias infectadas encontrada no presente estudo pode explicar o marcante recrutamento de leucócitos durante o processo inflamatório, corroborando os resultados descritos por Brasil et al. (2012).

A correlaao negativa entre a viabilidade celular, assim como a CCS, e a liberao de  $H_2O_2$  pelos leucócitos pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo extravasamento citoplasmático decorrente da morte celular por necrose que pode liberar grânulos citotóxicos e ERO para o ambiente mamário (Blagitz et al. 2011), e pelo fato que os PMNL provenientes de amostras de leite com alta celularidade estão mais propensos a sofrerem necrose que apoptose (Pessoa et al. 2012).

## CONCLUSÕES

O presente estudo fortalece a hipótese de que a CCS, assim como a sua viabilidade e funao, são conceitos intimamente relacionados com a saúde da glândula mamária.

Ademais, a maior liberao de  $H_2O_2$  pelos leucócitos em 1mL de leite nos quartos infectados pode contribuir, pelo

menos em parte, com o maior recrutamento de leucócitos para a glândula mamária e/ou a persistência do processo inflamatório.

**Agradecimentos.**- À FAPESP pelo auxílio financeiro concedido.

## REFERÊNCIAS

- Azedo M.R., Blagitz M.G., Souza F.N., Benesi F.J. & Della Libera A.M.M.P. 2011. Avaliação funcional de monócitos de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63(5):1131-1140.
- Blagitz M.G., Souza F.N., Gomes V. & Della Libera A.M.M.P. 2011. Apoptosis and necrosis of polymorphonuclear leukocytes in goat milk with high and low somatic cell counts. *Small Rumin. Res.* 100:67-71.
- Brasil F.A., Azedo M.R., Kitamura S.S., Blagitz M.G., Souza F.N. & Della Libera A.M.M.P. 2012. Liberação de peróxido de hidrogênio por fagócitos de glândulas mamárias bovinas hígdas e infectadas. *Ciência Rural* 42(4):701-704.
- Carneiro D.M.V.F., Domingues P.F. & Vaz A.K. 2009. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. *Ciência Rural* 39(6):1934-1943.
- Della Libera A.M.M.P., Birgel E.H., Kitamura S.S., Rosenfeld A.M.F., Mori E., Gomes C.O.M.S. & Araújo W.P. 2006. Macrófagos lácteos de búfalas hígdas: avaliações da fagocitose, espraçamento e liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 43(3):412-419.
- Della Libera A.M.M.P., Souza F.N., Blagitz M.G. & Batista C.F. 2011. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. *Arq. Inst. Biológico, São Paulo*, 78(2):297-300.
- Elazar S., Gonen E., Livneh-Kol A., Rosenshine I. & Sphigel N.Y. 2010. Essential role of neutrophils but not mammary alveolar macrophages in a murine model of acute *Escherichia coli* mastitis. *Vet. Res.* 41:53.
- Gilbert R.O., Grohn Y.T., Miller P.M. & Hoffman D.J. 1993. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 36:75-82.
- International Dairy Federation 2003. Ruminant mammary gland immunity. International Dairy Federation (IDF), Brussels, p.10-13.
- Jain N.C. & Jasper D.E. 1967. Viable cells in bovine milk. *Brit. Vet. J.* 123(2):57-63.
- Johnston Jr R.B. 1988. Monocytes and macrophages. *N. Engl. J. Med.* 318:747-752.
- Langoni H., Penachio D.S., Citadella J.C.C., Laurino F., Faccioli-Martins P.Y., Lucheis S.B., Menozzi B.D. & Silva A.V. 2011. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesq. Vet. Bras.* 31(12):1059-1065.
- Mehrzd J., Duchateau L. & Burvenich C. 2004. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 87:4150-4162.
- Mehrzd J., Duchateau L. & Burvenich C. 2005. High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Vet. Res.* 36:101-116.
- Mehrzd J., Jassen D., Duchateau L. & Burvenich C. 2008. Increase in *Escherichia coli* inoculum dose accelerates CD8<sup>+</sup> T-cell trafficking in the primiparous bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 91:193-201.
- Mehrzd J., Duchateau L. & Burvenich C. 2009. Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against *Staphylococcus aureus* in primiparous and multiparous cows during early lactation. *Vet. Microbiol.* 134:106-112.
- Niethammer P., Grabher C., Look T. & Mitchison T.J. 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459:996-1000.
- Oliveira C.M.C., Souza M.G.S., Silva N.S., Mendonça C.L., Silveira J.A.S., Oaigen R.P., Andrade S.J.T. & Barbosa J.D. 2011. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 31(2):104-110.
- Oliver S.P., Lewis M.J., Gillespie B.E., Dowlen H.H., Jaenicke E.C. & Roberts R.K. 2004. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. 4<sup>th</sup> ed. National Mastitis Council, Verona. 47p.
- Paape M.J., Bannerman D.D., Zhao X. & Lee J.-L. 2003. The bovine neutrophil: structure and function. *Vet. Res.* 34:597-627.
- Pessoa R.B., Blagitz M.G., Batista C.F., Santos B.P., Parra A.C., Souza F.N. & Della Libera A.M.M.P. 2012. Avaliação da apoptose de leucócitos polimorfonucleares CH138<sup>+</sup> em leite bovino de alta e baixa celularidade: dados preliminares. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 64(3):533-539.
- Pick E. & Keisari Y. 1980. A single colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 38:161-170.
- Pick E. & Mizel D. 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassays reader. *J. Immunol. Methods* 46:211-216.
- Rinaldi M., Moroni P., Paape M.J. & Bannerman D.D. 2007. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115:107-125.
- Rinaldi M., Moroni P., Paape M.J. & Bannerman D.D. 2008. Differential alterations in the ability of bovine neutrophils to generate extracellular and intracellular reactive oxygen species during the periparturient period. *Vet. J.* 178:208-213.
- Riollet C., Rainard P. & Poutrel B. 2011. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.* 84:1077-1084.
- Sarikaya H., Prgomet C., Pfaffl M.W. & Bruckmaier R.M. 2004. Differentiation of leukocytes in bovine milk. *Milchwissenschaft* 59:586-589.
- Schroten H., Uhlenbruck G., Hanisch F.G. & Mil A. 1987. Varying rates of phagocytosis of human blood monocytes and breast milk macrophages: Effect of intralipid and milk fat globules. *Monatsschr. Kinderheilkd* 135(1)36-40.
- Schukken Y.H., Wilson D.J., Welcome F., Garrison-Tikofsky L. & Gonzales R.N. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.* 34:579-596.
- Sladek Z. & Rysanek D. 2010. Apoptosis of resident and inflammatory macrophages before and during the inflammatory response of the virgin bovine mammary gland. *Acta Vet. Scand.* 52:12.
- Souza G.N., Brito J.R.F., Moreira E.C., Brito M.A.V.P. & Silva M.V.G.B. 2009. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(5):1015-1020.
- Souza F.N., Blagitz M.G., Latorre A.O., Mori C.S., Sucupira M.C.A. & Della Libera A.M.M.P. 2012. Effect of *in vitro* selenium supplementation on blood and milk neutrophils from dairy cows. *Pesq. Vet. Bras.* 32(2):174-178.