

Liberação de peróxido de hidrogênio por fagócitos de glândulas mamárias bovinas híidas e infectadas

Hydrogen peroxide release by phagocytes from healthy and infected bovine mammary gland

Fernanda Alves Brasil^I Milton Ricardo Azedo^{II} Sandra Satiko Kitamura^{III} Maiara Garcia Blagitz^I
Fernando Nogueira de Souza^I Alice Maria Melville Paiva Della Libera^{I*}

- NOTA -

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por fagócitos oriundos de glândulas mamárias bovinas sadias e infectadas. Desse modo, 73 amostras de leite provenientes das glândulas mamárias foram classificadas em sadias e infectadas de acordo com a cultura bacteriológica e a contagem de células somáticas (CCS). Após o isolamento das células do leite, procedeu-se à contagem diferencial de leucócitos e determinação da liberação de H_2O_2 pela oxidação da solução de vermelho fenol. Foi observada menor liberação de H_2O_2 pelos fagócitos oriundos dos quartos mamários infectados, assim como houve correlação negativa entre a liberação de H_2O_2 por fagócitos e a CCS ($r=-0,34$; $P=0,0025$), e a porcentagem de neutrófilos ($r=-0,24$; $P=0,04$). Além disso, houve tendência de menor liberação de H_2O_2 pelos fagócitos estimulados por forbol 12-miristato 13-acetato nas glândulas mamárias infectadas. Entretanto, observou-se maior liberação de H_2O_2 pelos fagócitos em 1mL de leite nos quartos mamários infectados, ao considerar a CCS mL^{-1} . Pode-se concluir que fagócitos de quartos mamários infectados apresentaram menor liberação de H_2O_2 , o que indica menor capacidade microbicida. Por outro lado, observou-se maior liberação de H_2O_2 pelos fagócitos em 1mL de leite nos quartos infectados, fato que pode contribuir com o maior recrutamento de leucócitos para a glândula mamária e/ou a persistência do processo inflamatório.

Palavras-chave: bovinos, glândulas mamárias, fagócitos, mastite, metabolismo oxidativo.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to evaluate the hydrogen peroxide (H_2O_2) release by phagocytes from

infected and uninfected mammary glands in dairy cows. Thus, milk samples from 73 quarters were divided in healthy and infected samples according to bacteriological culture and somatic cell count (SCC). After separation of milk cells, the samples were submitted to differential SCC and hydrogen peroxide release by oxidation of phenol red. There was a lower H_2O_2 release by phagocytes from infected quarters, as well as, a negative correlation between the H_2O_2 release by phagocytes and SCC ($r=-0.34$; $P=0.0025$) and percentage of neutrophils ($r=-0.24$; $P=0.04$). Furthermore, it was observed a tendency toward a lower H_2O_2 release by phagocytes stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate in the infected quarters. However, a higher H_2O_2 release by phagocytes was observed in milk samples from infected quarters by the estimation of the H_2O_2 release by phagocytes in 1mL of milk according to SCC mL^{-1} of each sample. The present study showed a decrease in H_2O_2 release by the infected quarters which indicate lower microbicidal activity. However, the higher H_2O_2 release by phagocytes in 1mL of milk in the infected quarters may contribute to recruitment of leukocytes to the site of infection and the persistence of infection.

Key words: bovine, mammary gland, mastitis, oxidative metabolism, phagocytes.

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária usualmente causada por bactérias, sendo a doença de maior impacto econômico na pecuária leiteira mundial. Esta é a principal enfermidade que afeta as vacas leiteiras, pois pode comprometer a segurança alimentar e a qualidade do leite, e pode estar

^IFaculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: dellalibera@usp.br. *Autor para correspondência.

^{II}Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), Santos, SP, Brasil.

^{III}Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Anhembi Morumbi (UAM), São Paulo, SP, Brasil.

associada a riscos de ocorrência de resíduos de antimicrobianos e às altas contagens de células somáticas (CCS) no leite (BARKEMA et al., 2006).

Após a entrada do patógeno na glândula mamária, os macrófagos e os neutrófilos juntamente com as células epiteliais iniciam o processo inflamatório em resposta à necessidade de eliminação do agente causador por meio da produção e liberação de citocinas que resulta na migração de leucócitos polimorfonucleares (PMNL) para a glândula mamária, considerados como a primeira linha de defesa celular contra patógenos. Essas células atuam na eliminação da infecção pela fagocitose e pela capacidade microbicida dada pela explosão respiratória resultante da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), entre elas o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (PAAPE et al., 2002). No entanto, as ERO produzidas pelos fagócitos, no ambiente extracelular, podem levar a danos teciduais e celulares, como a clivagem de proteínas, o que pode levar à amplificação do processo inflamatório e à maior migração de PMNL para a glândula mamária (KOBAYASHI et al., 2003). NIETHAMMER et al. (2009) demonstrou a importância do H_2O_2 no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório, mesmo em condições assépticas.

Alguns estudos avaliaram a capacidade microbicida em glândulas mamárias de vacas saudas e infectadas (MEHRZAD et al., 2004; MEHRZAD et al., 2005). No entanto, poucos estudos discriminaram a produção e a liberação de ERO, ou seja, a mensuração intracelular e extracelular de ERO (RINALDI et al., 2007; RINALDI et al., 2008). RINALDI et al. (2008) demonstraram a importância do ensaio utilizado para determinar a produção de ERO (intra- e extracelular) pelos fagócitos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de liberação de peróxido de hidrogênio por fagócitos oriundos de glândulas mamárias bovinas saudas e infectadas.

Foram utilizadas 73 amostras de leite provenientes de glândulas mamárias de vacas da raça holandesa em diferentes fases da lactação, oriundas de propriedades localizadas no estado de São Paulo, que foram divididas em saudas e infectadas, de acordo com a cultura bacteriológica e a CCS. As glândulas mamárias foram classificadas como saudas, quando as amostras de leite apresentaram CCS abaixo de $2,5 \times 10^5$ células mL^{-1} e sem isolamento bacteriano em dois exames bacteriológicos com intervalo de uma semana. As glândulas mamárias foram consideradas infectadas quando foi isolado pelo menos um agente causador de mastite no exame bacteriológico.

Inicialmente, coletaram-se assepticamente as amostras de leite para o exame bacteriológico, CCS, contagem leucocitária diferencial e para a realização do ensaio para determinação da liberação de H_2O_2 . A CCS foi realizada no aparelho Somacount 300 (Bentley Instruments®, Chaska, EUA). A contagem leucocitária diferencial foi realizada em microscopia óptica conforme previamente descrito por DELLA LIBERA (2006). O exame bacteriológico foi realizado pela cultura de 0,01 mL 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 500 mL de leite de cada quarto mamário juntamente com 500 mL de solução salina tamponada. Após o isolamento, as células foram ressuspensas em 1 mL 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 DELLA LIBERA et al. (2006). As amostras sem estímulo e estimuladas por 10 ng mL^{-1} de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e as soluções padrão (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 nmoles de H_2O_2 $100 \mu L^{-1}$ da SFV) foram realizadas em quadruplicatas. A placa foi incubada por uma hora a 37°C, em câmara úmida, e, após esse período, a reação foi bloqueada pela adição de 10 μL de solução normal de NaOH, e a absorbância determinada a 620 nm. O resultado foi expresso em nmoles de H_2O_2 / 2×10^5 células viáveis.

Portanto, com o intuito de estimar a concentração de H_2O_2 resultante da liberação de H_2O_2 pelos fagócitos em 1 mL de leite ($[H_2O_2]$ mL^{-1} leite), considerando a celularidade de cada amostra, o seguinte cálculo foi aplicado:

$$[H_2O_2] \text{ mL}^{-1} \text{ leite} = \frac{CCS \text{ mL}^{-1}}{2 \times 10^5} \times \text{nmoles de } H_2O_2$$

Para a análise dos resultados, foi verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As correlações entre os resultados foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. O teste T Student para amostras não pareadas foi aplicado para verificar diferenças entre os grupos. Para os dados com distribuição não paramétrica, o teste de Mann-Whitney foi utilizado (SAMPAIO, 2002). A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

No presente estudo, 53 (72,60%) das 73 amostras de leite analisadas foram positivas no exame bacteriológico. Dessas amostras, de 29 (54,72%), 20

(37,74%) e 4 (7,54%) foram isoladas bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp., respectivamente. A média (\pm desvio-padrão) da CCS no leite foi de 1.420.000 (\pm 2.030.000 células mL⁻¹) em glândulas mamárias infectadas e de 49.600 (\pm 61.300 células mL⁻¹) em glândulas mamárias sadias ($P < 0,0001$). No entanto, não se observaram diferenças significativas na porcentagem de macrófagos ($P = 0,26$), monócitos ($P = 0,20$) e linfócitos ($P = 0,30$) no leite das glândulas mamárias sadias e infectadas, embora se tenha encontrado tendência de maior porcentagem de neutrófilos no leite das glândulas mamárias infectadas ($P = 0,10$). Durante o processo infeccioso, ocorre significativo aumento desta população leucocitária, devido à migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, na tentativa de eliminar a infecção pela fagocitose e produção intracelular de ERO (PAAPE et al., 2002).

A liberação de H₂O₂ pelos fagócitos lácteos foi menor nas glândulas mamárias infectadas (14,22 \pm 20,72nmol/0,25 \times 10⁵ células) que em glândulas mamárias sadias (21,27 \pm 22,29nmol/0,25 \times 10⁵ células) ($P = 0,01$). Contudo, não se observou diferença na liberação de H₂O₂ pelos fagócitos de glândulas infectadas em função dos diferentes patógenos isolados neste estudo. Além disso, observou-se tendência à menor liberação de H₂O₂ estimulada por PMA nas glândulas mamárias infectadas (15,37 \pm 18,40nmol/0,25 \times 10⁵ células) em relação às glândulas mamárias sadias (22,67 \pm 22,72nmol/0,25 \times 10⁵ células) ($P = 0,06$).

Além disso, foi observada correlação negativa entre a CCS e a liberação de H₂O₂ sem estímulo ($r = -0,34$; $P = 0,0025$) e nas amostras estimuladas por PMA ($r = -0,39$; $P = 0,0006$). O presente estudo também identificou correlação negativa entre a liberação de H₂O₂ e a porcentagem de neutrófilos ($r = -0,24$; $P = 0,04$), apesar de essa correlação não ser identificada nas amostras estimuladas por PMA ($r = -0,14$; $P = 0,24$). No entanto, não se encontrou correlação significativa entre a porcentagem de macrófagos e monócitos ($P > 0,05$) e a liberação de H₂O₂ estimuladas ou não por PMA. Em contraste, MEHRZAD et al. (2004) e MEHRZAD et al. (2005) encontraram maior produção de ERO pelos PMNL provenientes de glândulas mamárias experimentalmente infectadas por *Escherichia coli*. No entanto, esses autores utilizaram o ensaio de quimioluminescência do luminol, que mensura tanto a produção intracelular quanto a liberação 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 produção

intracelular de ERO pelos neutrófilos no dia do parto em vacas leiteiras, enquanto GILBERT et al. (1993) demonstraram menor liberação de ERO no período periparturiente, ao tentarem avaliar a capacidade microbicida dessa população celular.

Entretanto, ao estimar a liberação de H₂O₂ pelos fagócitos em 1mL de leite em função da CCS mL⁻¹ de cada amostra, observou-se maior liberação de H₂O₂ pelos fagócitos provenientes das glândulas mamárias infectadas (76,68 \pm 219nmol de H₂O₂ mL⁻¹) do que com as glândulas mamárias sadias (5,60 \pm 7,59nmol de H₂O₂ mL⁻¹) ($P < 0,0001$). No entanto, não se encontrou diferença na liberação de H₂O₂ pelos fagócitos em 1mL de leite nas glândulas mamárias infectadas pelos diferentes patógenos isolados neste estudo.

A liberação de H₂O₂ pelos fagócitos em 1mL de leite nas glândulas mamárias infectadas pode explicar o marcante recrutamento de leucócitos durante o processo inflamatório da glândula mamária, considerando a importância do H₂O₂ sobre o recrutamento de leucócitos e a mediação do processo inflamatório (NIETHAMMER et al., 2009).

Desse modo, pode-se concluir que os quartos mamários infectados apresentaram menor liberação de H₂O₂ pelos fagócitos, o que indica menor capacidade microbicida. Por outro lado, observou-se maior liberação de H₂O₂ pelos fagócitos em 1mL de leite nos quartos infectados, fato que pode contribuir, em parte, com o maior recrutamento de leucócitos para a glândula mamária e/ou a persistência do processo inflamatório.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Cláudia Regina Stricagnolo e à Clara Satsuki Mori, pela incomensurável ajuda, e à FAPESP (Processo nº 2003/06412-7), pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BARKEMA, H.W. et al. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1877-1895, 2006. Disponível em: <<http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS002203021100004X.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2011. doi: 10.3168/jds.2010-3715.
- DELLA LIBERA, A.M.M.P. et al. Macrófagos lácteos de búfalas hígdas: avaliações da fagocitose, espraçamento e liberação de H₂O₂. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, n.3, p.412-419, 2006. Disponível em: <http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?pid=S1413-95962006000300017&script=sci_arttext>. Acesso em: 5 set. 2011.
- GILBERT, R.O. et al. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. **Veterinary Immunology**

- and **Immunopathology**, v.36, p.75-82, 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016524279390007Q>>. Acesso em: 5 set. 2011.
- KOBAYASHI, S.D. et al. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes and Infection**, v.5, p.1337-1344, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457903002545>>. Acesso em: 16 out. 2011.
- MEHRZAD, J. et al. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.4150-4162, 2004. Disponível em: <<http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030204735584.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2011.
- MEHRZAD, J. et al. High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. **Veterinary Research**, v.36, p.101-116, 2005. Disponível em: <http://www.vetres-archive.org//file/Vet.Res._0928-4249_2005_36_1/Vet.Res._0928-4249_2005_36_1_ART0009.pdf>. Acesso em: 5 set. 2011. doi: 10.1051/vetres:2004055.
- NIETHAMMER, P. et al. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. **Nature**, v.459, p.996-1000, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v459/n7249/full/nature08119.html>>. Acesso em: 5 set. 2011. doi: 10.1038/nature08119.
- OLIVER, S.P. et al. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. Verona: National Mastitis Council, 2004. 47p.
- PAAPE, M.J. et al. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.7, p.109-121, 2002. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/t628613h465mpv9u/>>. Acesso em: 5 set. 2011. doi: 10.1023/A:1020343717817.
- RINALDI, M. et al. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.115, p.107-125, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242706002728>>. Acesso em: 5 set. 2011. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.09.009.
- RINALDI, M. et al. Differential alterations in the ability of bovine neutrophils to generate extracellular and intracellular reactive oxygen species during the periparturient period. **Veterinary Journal**, v.178, p.208-213, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307002699>>. Acesso em: 5 set. 2011. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.07.030.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. 264p.