

INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE PARTOS NA ATIVIDADE BACTERICIDA INDIRETA DOS FAGÓCITOS DO COLOSTRO BOVINO PARA A *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÊNICA (ECET)

GOMES, V.^{1,2}; MADUREIRA, K.M.^{1,2}; BLAGITZ, M.G.²; DELLA LIBERA,
A.M.M.P.²; BENESI, F.J.²

1. Faculdade de Medicina Veterinária – Centro Universitário Anhanguera – UNIFIAN/Leme

2. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo – FMVZ/USP

1. INTRODUÇÃO

A diarreia causada pela *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET) representa uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade em bezerros neonatos. A frequência de diarreia causada pela ECET é mais elevada nos primeiros dias de vida, e diminui nas faixas etárias superiores (NAGY; FEKETE, 1999).

Vários pesquisadores ressaltam a importância das células provenientes do colostro na imunidade da mucosa intestinal, principalmente linfócitos, pois estão envolvidos na produção de imunoglobulinas, que impedem a ligação da ECET ao enterócito do hospedeiro (ROTHKÖTTER; PABST; BAILEY, 1999). No entanto, o conhecimento sobre o significado da atividade celular na proteção contra infecções neonatais ainda é limitado.

Riedel-Caspari e Schmidt (1991 a, b, c, d) utilizaram quatro grupos experimentais compostos por 16 bezerros cada. O Grupo COL + que recebeu colostro completo; o grupo COL – que recebeu colostro sem leucócitos; o grupo MS+ que recebeu substituto lácteo suplementado com leucócitos do colostro, e o grupo MS- recebeu apenas substituto lácteo. Os autores verificaram que os animais dos grupos COL + e COL – não apresentaram diferenças quando se comparou o número de linfócitos no sangue analisado no segundo dia de vida; tiveram igual resposta à blastogênese induzida pela concoalina A. No entanto, o grupo COL + apresentou: maior quantidade de anticorpos contra hemácias de ovinos; maior proliferação espontânea de células mononucleares; maiores concentrações de anticorpos específicos contra *Escherichia coli*, principalmente IgG; maiores concentrações de neutrófilos atividade de suas enzimas lisossomais e resposta à fagocitose de *Streptococcus agalactiae*; a atividade bactericida para a *Escherichia coli* também foi maior no grupo COL +. Os animais que receberam substituto do colostro suplementado com leucócitos colostrais (MS +) apresentaram menor resposta imunológica em relação aos parâmetros avaliados, quando comparados aos animais que receberam colostro (COL + e COL -), porém, mostraram maior resposta imunológica quando comparado aos animais que receberam apenas substituto lácteo (MS-).

Riedel-Caspari (1993) verificou a atividade bactericida dos leucócitos colostrais em 20 bezerros infectados experimentalmente com *Escherichia coli* enteropatogênica (ECEP), três horas após o nascimento e, forneceram “pool” de colostro sem leucócitos a um grupo constituído por 10 animais, logo após a infecção e nos dois dias subsequentes; ao segundo grupo foi fornecido um “pool de colostro suplementado com leucócitos”. Nesta pesquisa, observaram que o segundo grupo excretara menos bactéria em suas fezes nas primeiras semanas pós-infecção, além de apresentarem maiores teores séricos de imunoglobulinas específicas (IgA e IgM) contra esta cepa bacteriana. O aumento das taxas séricas de imunoglobulinas específicas para ECEP

sugerem que os linfócitos do colostro exercem atividade efetora, além de sua ação direta contra os patógenos.

A fagocitose é um dos principais mecanismos de destruição de bactérias. Esse mecanismo constitui uma das primeiras linhas de defesa contra as infecções. O reconhecimento da partícula ou microorganismo a ser englobado pelo fagócito inicia-se com a aderência desta a membrana celular. Esta interação pode ocorrer por meio de receptores específicos, sem a presença de outros fatores imunológicos. No entanto, o processo de fagocitose pode ser potencializado se o microorganismo for previamente opsonizado com proteínas (imunoglobulinas e componentes do sistema complemento) do sobrenadante do colostro (HONÓRIO, 1995).

Após a fagocitose, macrófagos e neutrófilos iniciam a mobilização dos mecanismos bactericidas dependentes e independentes de oxigênio. Os mecanismos independentes de oxigênio empregam alterações bactericidas de pH nos fagolisossomos (junção da partícula englobada e enzimas lisossômicas no citoplasma do fagócito) e enzimas lisossômicas como: proteases, ácido ribonuclease, β galactosidase e fosfolipases (PAAPE et al., 1991).

Os mecanismos dependentes de oxigênio envolvem oxidação via mecanismo denominado de “explosão respiratória” (“*respiratory burst*”). (TIZARD, 2002). A explosão respiratória inicia-se com a ativação da Nicotinamida-Adenosina- Difosfato (NADPH) oxidase, localizada na membrana celular do leucócito, que converte o oxigênio (O_2) molecular do tecido circundante em superóxido (O_2^-). A NADPH doaria elétrons a partir da ativação da via glicolítica das hexosesmonofosfato. Este rápido consumo de oxigênio seguido da formação do superóxido é referido como aceleração respiratória. O superóxido converte-se em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da superóxido desmutase (SOD). Em presença da enzima catalase predominante em macrófagos maduros, descreveu-se a geração do radical hidroxila ($OH\cdot$), o oxigênio singlete (1O_2), cloraminas e aldeídos. Nos polimorfonucleares neutrófilos a principal via enzimática é a da mieloperoxidase, enzima lisossômica liberada no fagolisossoma, sendo os íons de peróxido e cloreto convertidos em ácido hipocloroso com atividade bactericida (CHAMPE; HARVEY, 1996).

A investigação da atividade bactericida dos fagócitos “in vitro” pode ser realizada por meio de abordagem indireta, medindo produtos metabólicos celulares associados a esta atividade. Os métodos de avaliação indireta da atividade bactericida dos fagócitos baseiam-se na detecção de produtos do metabolismo oxidativo. Destacam-se entre eles os que verificam o consumo de oxigênio e os que quantificam produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (PICK; MIZEL, 1981).

A idade da vaca e o estágio de lactação são fatores que podem interferir na fagocitose de bactérias pelos neutrófilos (MILLER; PAAPE; DULIN, 1985).

2. OBJETIVOS

Em função da carência de pesquisas sobre a função dos fagócitos do colostro bovino, a influência do número de partos sobre a atividade destas células, e a importância da ECET nos quadros de diarreias em bezerros neonatos, o presente trabalho verificou a influência do número de partos na atividade bactericida indireta dos fagócitos do colostro bovino para a *Escherichia coli* enterotoxigênica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de colostro foram colhidas de quatro propriedades leiteiras localizadas no interior de São Paulo. Todas as amostras positivas ao exame bacteriológico do colostro foram excluídas desta pesquisa.

Foram utilizadas 53 vacas holandesas, encaminhadas para a sala de ordenha imediatamente após o parto, onde foram realizadas as colheitas das amostras, sempre antes da realização da primeira ordenha pós-parto. Foram anotados os dados relativos ao número de partos de todas as fêmeas doadoras de colostro.

Para a colheita das amostras de colostro, foram adotados métodos de anti-sepsia, para isso, precedia-se a limpeza e desinfecção dos tetos, com uso de água e hipoclorito, secagem dos mesmos com papel toalha, e desinfecção dos orifícios dos tetos com etanol a 70%.

A primeira alíquota das amostras foram colhidas em 4 tubos Falcon estéreis com capacidade de 50 mL, nos quais foram adicionados 20 mL de colostro puro e 20 mL de solução salina tamponada (PBS) totalizando um volume de 40 mL de colostro diluído na proporção de 1:1, e transportados até o laboratório sob refrigeração à aproximadamente 4°C, acondicionados em caixa de material isotérmico imersas em gelo triturado. Esta alíquota destinou-se a obtenção dos fagócitos do colostro bovino.

A segunda alíquota das amostras foi colhida em tubos Falcon com capacidade de 15 mL, acrescidos de 10 mL de colostro puro, destinada a obtenção do soro colostrado, utilizado para a opsonização da ECET nos ensaios da atividade bactericida indireta dos fagócitos.

Para verificar a atividade bactericida dos fagócitos e a importância da opsonização prévia da bactéria, foram utilizadas células de colostro em presença de suspensão bacteriana previamente opsonizada ou não, com o sobrenadante do colostro. Foram utilizados os seguintes ensaios:

Ensaio Controle: Realizado com o uso somente de suspensão de fagócitos mononucleares e polimorfonucleares (C);

Ensaio Experimentais: Realizados com a utilização de fagócitos mononucleares e polimorfonucleares em suspensão de ECET não opsonizada (NO);

Controle: Realizado com o uso de fagócitos mononucleares e polimorfonucleares em suspensão de ECET previamente opsonizada em 10% de "pool" de sobrenadante de colostro bovino delipidado (O).

Para a obtenção e separação dos fagócitos do colostro bovino, os quatro tubos Falcon contendo 20 mL de colostro diluído em PBS, de cada uma das amostras de colostro, foram centrifugados a 1.500 rpm durante 10 minutos à 4°C. A centrifugação permitiu a separação do colostro em três fases nítidas: o "botão" celular, uma porção fluída intermediária e uma camada de gordura. A camada superior composta de gordura e a porção fluída (sobrenadante) foram desprezadas, e o botão celular foi conservado, ressuscitado em 40 mL de PBS gelado e novamente centrifugado.

O botão celular obtido da segunda centrifugação de cada um dos quatro tubos Falcon, foi ressuscitado em 10 mL de RPMI 1640 gelado. Após, juntou-se o conteúdo de todos os frascos em apenas um tubo Falcon, totalizando um volume de 40 mL. O tubo Falcon foi novamente centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular novamente ressuscitado em RPMI gelado.

As células viáveis da suspensão celular foram contadas em câmara hematómetrica de Neubauer.

A análise da viabilidade celular foi realizada nas suspensões celulares de acordo com a técnica utilizada por Della Libera, 2002.

Para avaliar (*in vitro*) a atividade bactericida dos fagócitos do colostro, foi utilizada uma cepa de ECET do grupo F5 (K99), isolada de um bezerro com diarreia. Dezoito horas antes da realização dos ensaios de fagocitose, a *Escherichia coli* F5, mantida em ágar semi-sólido e em ausência de luz, foi repicada em tubos contendo 5 mL de BHI líquido, e estes incubados em estufa a 37°C por 18 horas. Após este período, a bactéria foi lavada duas vezes em solução salina tamponada e inativada por uma hora a 60°C. A seguir, a concentração bacteriana foi ajustada com a utilização de espectrofotômetro, a 540 nanômetros e densidade óptica de 0,2 (D.O = 0,2), e reservadas para a opsonização e realização dos ensaios de fagocitose.

A liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é quantificada pelo método de oxidação da peroxidase dependente de vermelho de fenol (PONTES, 1999). Após a fagocitose da *Escherichia coli* F5 pelos fagócitos, as suspensões de células e bactérias (tubos 01 e 02), assim como o tubo contendo o controle (tubo 03) foram centrifugadas a 160G, sendo o sobrenadante desprezado para retirada do excesso de bactéria extracelular, e ressuspendidos em solução de vermelho de fenol. O controle contendo somente células foi realizado paralelamente para verificação da liberação espontânea do peróxido de hidrogênio pelas células na ausência da ECET F5.

A curva padrão de peróxido de hidrogênio foi estabelecida a partir de concentrações molares conhecidas (0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 nmoles de H₂O₂/100µl de solução de vermelho de fenol). A curva e o branco (solução de vermelho de fenol) foram incubados em placas ELISA A/2 de 96 poços, com um volume de 100µl por alvéolo e as suspensões celulares incubadas em tubos plásticos do tipo Falcon estéril.

As placas e os tubos 01, 02 e 03 permaneceram em estufa a 37°C durante uma hora. Após esse período, os tubos foram centrifugados e 100µl/alvéolo do sobrenadante desses tubos foram colocados em duplicata nos poços das linhas A e E das placas de ELISA, já preenchidas com a curva e o branco. Houve a necessidade da realização de diluição seriada até 10⁻⁸ do sobrenadante dos tubos em solução de fenol vermelho, pois a concentração de água oxigenada foi maior que os valores da curva padrão. A concentração de H₂O₂ foi medida após adição de 10µl de uma solução de NaOH 1N, por alvéolo, e a leitura feita em filtro 630 nm. Os resultados obtidos em densidade óptica (D.O.) foram transformados em nmoles de água oxigenada liberados por número de células utilizadas (2x10⁶ células), mediante equação de regressão linear construída com base na curva padrão, multiplicado pela diluição do sobrenadante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de peróxido de hidrogênio em nmoles/milhões de fagócitos do colostro, conforme o número de partos, estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de H₂O₂ liberados pelos fagócitos presentes no colostro de fêmeas bovinas, nos grupos C, NO e O conforme o número de partos.

Nº de partos	C	NO	O
1	181,7 ± 76,6 ^A	226,1 ± 56,0 ^A	263,9 ± 14,5 ^A
2	94,7 ± 85,2 ^B	84,9 ± 66,1 ^{BC}	106,9 ± 101,1 ^B
3	106,3 ± 95,0 ^{AB}	138,2 ± 0,0 ^{AB}	150,9 ± 0,0 ^{AB}
4	129,6 ± 95,9 ^{AB}	122,3 ± 70,7 ^B	83,5 ± 58,5 ^{BC}
5	19,4 ± 8,7 ^B	16,7 ± 10,1 ^C	17,5 ± 5,6 ^C
Significância	P<0,05	P<0,007	P<0,01

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre si.

A atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino para a ECET pôde ser observada nesta pesquisa, como relatado anteriormente por Riedel-Caspari & Schimidt (1991 a, b, c, d) e Riedel-Caspari (1993).

Na presente investigação pôde-se observar que o número de partos interferiu na fagocitose da ECET pelos fagócitos do colostro bovino, concordando com o relatado por Miller, Paape e Dulin (1985).

A quantidade de peróxido de hidrogênio liberada nos grupo controle, NO e O foi maior nos animais de primeira lactação, diminuindo nas lactações posteriores até atingir o menor valor nos animais com 05 parições. Ou seja, os fagócitos do colostro de vacas com menor número de lactação apresentaram maior atividade bactericida. Pôde-se observar que a resposta bactericida nos grupos NO e O também foi maior nos animais de primeira, segunda e terceira lactação, determinando maior fagocitose e liberação de água oxigenada nos grupos experimentais contendo ECET.

A liberação de água oxigenada no grupo controle pode ter sido provocada pela fagocitose inespecífica dos macrófagos do colostro bovino, pois o colostro possui uma grande concentração de glóbulos de gordura e outras substâncias, que poderiam ser fagocitadas e estimulariam a liberação de peróxido de hidrogênio, mesmo na ausência da ECET.

5- CONCLUSÃO

A atividade bactericida dos fagócitos do colostro bovino na ausência ou presença de ECET opsonizada ou não, foi maior nos animais mais jovens, o que nos leva a pressupor que estes animais apresentam maior resposta imunológica inespecífica que os animais com maior número de partos. No entanto, com base nestes resultados não se pode definir se o colostro proveniente destas vacas possui maior qualidade, pois a resposta imunológica específica não foi avaliada, e a literatura relata que vacas mais velhas apresentam maiores concentrações de imunoglobulinas.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUESCHER, S. E.; MCLLHERAN, S. M. Polymorphonuclear leukocytes and human colostrum: effects of in vivo and in vitro exposure. **Journal Peadiatric Gastroenterology Nutricional**, v. 17, p. 424-433, 1993.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica Ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.

- DELLA LIBERA, A. M. M. P. **Avaliação dos fagócitos no leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2002. 125 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- HONÓRIO, A. C. **Atividade bactericida dos fagócitos do colostro humano para a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**. São Paulo, 1995. 125 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- MILLER, R. H.; PAAPE, M J.; DULIN, A. M. Relationship between immunoglobulin concentration in milk and phagocytosis by bovine neutrophils. **American Journal Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 42-45, 1985.
- NAGY, B.; FEKETE, P. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Veterinary Research**, v. 30, p. 259-284, 1999.
- PAAPE, M. J.; GILDREY, A. J.; JAIN, N. V.; MILLER, R. H. Leukocytic defense mechanisms in the udder In: BURVENICH, C.; VANDEPUTTE-VAN MESSON, G.; HILL, A. W. **New insights into the pathogenesis of mastitis**. Belgium: 1991, p. 95-105.
- PONTES, G. N. **Avaliação da atividade fagocitária e microbicida de células do colostro humano para *Salmonella typhimurium***. São Paulo, 1999. 114 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- RIEDEL-CASPARI, G. The influence of colostrum leukocytes on the course of an experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 35, p. 275-288, 1993.
- RIEDEL-CASPARI, G.; SCHMIDT, F. W. The influence of colostrum leukocytes on the immune system of the neonatal calf. II Effects on passive and active immunization. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 98, p. 165-204, 1991a.
- RIEDEL-CASPARI, G.; SCHMIDT, F. W. The influence of colostrum leukocytes on the immune system of the neonatal calf. III Effects on phagocytosis. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 98, p. 325-364, 1991b.
- RIEDEL-CASPARI, G.; SCHMIDT, F. W. The influence of colostrum leukocytes on the immune system of the neonatal calf. IV Effects on bactericidal activity, complement and interferon. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 98, p. 395-398, 1991c.
- RIEDEL-CASPARI, G.; SCHMIDT, F. W. Übersichtsreferat: Die Kolostralleukozyten und ihre Bedeutung für das Immunsystem des Neugeborenen. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 97, p. 137-192, 1991d.
- ROTHKÖTTER, H. J.; PABST, R.; BAILEY, M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 157-165, 1999.
- TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002, 532 p.