

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO *IN VITRO* DE SELÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO INTRACELULAR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES DE BOVINOS: IMPLICAÇÕES NA RESISTÊNCIA À MASTITE

Fernando N. Souza¹, Maiara G. Blagitz², Andréia O. Latorre³, Camila Silano⁴, Kátia A. Souza⁴, Glauco D. Glütler⁴, Camila F. Batista¹, Clara S. Mori³, Maria Claudia A. Sucupira³, Alice M.M.P. Della Libera¹

1. Médico Veterinário, mestrando, Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo- SP, Brasil. CEP 05508-270. E-mail: nogueirasouza@usp.br (autor correspondente)
2. Médica Veterinária, doutoranda, Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
3. Médica Veterinária, doutoranda, Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
4. Acadêmicos do Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
5. Química, Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
6. Médicas Veterinárias, doutoras, professoras do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

PALAVRAS-CHAVES: Citometria de fluxo, glândula mamária, neutrófilos, resposta imune.

ABSTRACT

EFFECT OF *IN VITRO* SELENIUM SUPPLEMENTATION ON INTRACELLULAR HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION BY BOVINE POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES: IMPLICATIONS FOR MASTITIS CONTROL

This study evaluates the effect of *in vitro* selenium supplementation on intracellular hydrogen peroxide production by bovine polymorphonuclear leukocytes of dairy cows. Thus, a total of 16 blood and milk samples were collected. Cells were then incubated with 50µM 2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate for 30 minutes at 37° C. After selenium supplementation, evidence showed sodium selenite at concentrations of 0-10 µM. Results revealed an increase in reactive oxygen species production of polymorphonuclear cells, which may lead to the enhancement of mammary gland immunity.

KEYWORDS: Flow cytometry, immune response, mammary gland, neutrophils.

INTRODUÇÃO

A mastite não é apenas a doença de maior impacto na pecuária leiteira mundial, mas é também a principal enfermidade que afeta a indústria de laticínios comprometendo a segurança alimentar e qualidade do leite associados aos resíduos de antimicrobianos e às altas contagens de células somáticas.

Logo após a entrada do patógeno na mama, os macrófagos juntamente com as células epiteliais iniciam o processo inflamatório em resposta a necessidade de eliminação do agente invasor através da produção e liberação de citocinas que resulta na migração de células polimorfonucleares (PMN), principalmente neutrófilos, do sangue para a glândula mamária, conferindo assim a primeira linha de defesa contra patógenos. Estas células atuam na eliminação da infecção pela fagocitose e pela capacidade microbicida dada pela explosão respiratória resultante da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio, entre elas o peróxido de hidrogênio (PAAPE et al., 2003).

Nos últimos anos, na tentativa de diminuir o impacto da mastite e a utilização de antimicrobianos em fazendas leiteiras, grandes esforços foram realizados na tentativa de aumentar os mecanismos de defesa da glândula mamária. Neste contexto, estudos apontaram para a redução dos casos de mastite e da contagem de células somáticas em animais suplementados com selênio (Se) (HOGAN et al., 1993; HEMINGWAY et al., 1999; SALMAN et al., 2009). Porém, poucos são os estudos que tentaram elucidar os mecanismos pelos quais este elemento atua.

O Se apresenta importante participação no sistema imune, além de conferir proteção contra as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O primeiro relato que demonstrou o envolvimento deste elemento na resposta imune é datado de 1959, onde foram encontradas maiores concentrações deste elemento em tecidos com significativa importância imunológica como o baço, os linfonodos e o fígado. Várias das ações no sistema imune do Se já descritas citam a participação das selenoproteínas, merecendo destaque neste contexto a glutathione peroxidase 1 (GSH-Px1). Esta enzima participa do sistema antioxidante convertendo o peróxido de hidrogênio em compostos menos tóxicos. Ademais, mais de 50 proteínas têm sido relacionadas a este elemento em várias espécies. No entanto, os efeitos diretos de compostos do Se não podem ser excluídos (McKENZIE et al., 1998).

Assim, o presente estudo objetivou investigar o efeito da suplementação *in vitro* de selênio sobre a capacidade microbicida de células PMN do sangue e da mama de bovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizadas 16 amostras de sangue e 16 amostras de leite de vacas em lactação oriundas de propriedade localizada no Estado de São Paulo. Foi colhida uma amostra de sangue heparinizado de cada animal, e no mínimo 50 ml de leite de cada quarto mamário diluído na proporção 1:1 em solução salina tamponada (SST), e então mantidos a 4° C.

As amostras de leite foram submetidas à centrifugação a 1000 g por 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante e retirada a camada de gordura. O botão celular resultante foi resuspenso em 30 ml de SST, e centrifugados novamente a 400g por 10 minutos. Posteriormente, o botão celular foi novamente resuspenso em 500 µL de RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino. Finalmente, foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer e avaliada a viabilidade celular pela exclusão do azul de Trypan.

A produção intracelular de peróxido de hidrogênio se deu pela utilização de 100 µL de sangue de cada animal e 2×10^5 células viáveis do leite de cada quarto mamário que foram incubados a 37° C por 30 minutos com 50µM de 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Para avaliação do efeito da suplementação de Se foi adicionado ao meio de cultura celular, solução de selenito de sódio ($\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$) resultando na concentração final de 0 µM (basal) e 10 µM de $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$.

As amostras foram, então, analisadas por citometria de fluxo, onde 30.000 eventos foram adquiridos. A população de células PMN foi identificada pela sua característica de tamanho e granulosidade dada pela citometria de fluxo. A porcentagem de células que produziram peróxido de hidrogênio, assim como a intensidade da produção de intracelular de peróxido de hidrogênio, em valores arbitrários, foram dadas pela análise no programa FlowJo Tree Star Software®.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, USA) utilizando o teste t para amostras pareadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram maior produção intracelular de peróxido de hidrogênio pelos leucócitos PMN sangüíneos e lácteos das amostras suplementadas *in vitro* com 10 µM de selenito de sódio. As amostras sangüíneas apresentaram valores médios arbitrários de 422,14 (\pm 143,48) e 935,03 (\pm 490,97) ($p = 0,0001$) para as amostras sem e com suplementação, respectivamente. Os leucócitos PMN provenientes das amostras lácteas

apresentaram valores médios arbitrários de produção intracelular de peróxido de hidrogênio de 28,46 (\pm 15,17) e 40,75 (\pm 19,15) ($p = 0,0001$) para as amostras sem e com suplementação com selenito de sódio, respectivamente. A porcentagem de PMN que produziram peróxido de hidrogênio no sangue foi de 99,63 % (\pm 0,42) e 99,65 % (\pm 0,65) ($p = 0,87$), e no leite foi de 90,87 % (\pm 10,71) e 98,58 % (\pm 2,19) ($p = 0,0127$) para as amostras sem e com suplementação, respectivamente.

Semelhante a estes achados, alguns autores têm apontado maior capacidade microbicida em animais com níveis adequados de selênio (WURYASTUTI et al., 1993; SALMAN et al., 2009). Além disso, uma correlação negativa entre a contagem de células somáticas e níveis séricos de selênio têm sido freqüentemente reportados (HEMINGWAY et al., 1999; SALMAN et al., 2009).

Ademais, inúmeros estudos sugerem que a deficiência de selênio pode levar a maior susceptibilidade a doenças ou a progressão da mesma. Assim, a manutenção de níveis adequados de Se é essencial para a regulação da resposta imune, além de proteger contra os danos oxidativos (McKENZIE et al., 1998; RAYMAN, 2000). É ainda sugerido, que a suplementação com Se pode apresentar efeito imunoestimulatório mesmo em pacientes com níveis adequados de selênio (RAYMAN, 2000), o que advir de seus efeitos diretos. Isto, por exemplo, já foi descrito em células T, onde o selênio apresentou função regulatória na expressão de receptores de interleucina-2 (IL-2) (McKENZIE et al., 1998). Desta maneira, isto também pode explicar os efeitos benéficos adquiridos com a suplementação de selênio dado pelo seu efeito regulatório na expressão dos receptores envolvidos com esta citocina, já que é conhecido que a infusão intramamária de IL-2 resulta em maior taxa de cura de animais infectados com *Staphylococcus aureus* (SALMAN et al., 2009).

CONCLUSÃO

O presente estudo apontou para aumento da capacidade microbicida *in vitro* de células polimorfonucleares suplementadas com Se em bovinos. Assim, a suplementação de Se pode apresentar como ferramenta viável no controle da mastite e demais enfermidades.

REFERÊNCIAS

HEMINGWAY, R. G. The influence of dietary selenium and vitamin E intakes on milk somatic cell counts and mastitis in cows. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 23, p. 481-499, 1999.

HOGAN, J. S.; WEISS, W. P.; SMITH, K. L. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 2795-2803, 1993.

McKENZIE, R. C.; RAFFERTY, T. S.; BECKETT, G. J. Selenium: an essential element for immune function. **Immunology Today**, Cambridge, v. 19, n. 8, p. 342-345, 1998.

PAAPE, M. J.; BANNERMANN, D. D.; ZHAO, X.; LEE, J-W. The bovine neutrophil: structure and function. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 34, p. 597-627, 2003.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, London, v. 356, p. 233-241, 2000.

SALMAN, S.; KHOL-PARISINI, SCHAFFT, H.; LAHRSEN-WIEDERHOLT, M.; HULAN, H.W.; DINSE, D.; ZENTEK, J. The role of dietary selenium in bovine mammary gland health and immune function. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 10, n. 1, p. 21-34, 2009.

WURYASTUTI, H.; STOWE, H. D.; BULL, R. W.; MILLER, E. R. Effects of vitamin E and selenium on immune responses of peripheral blood, colostrum, and milk leukocytes of sows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, p. 2464-2472, 1993.