

MODELO DE ESTUDO *IN VITRO* DE INFECÇÕES BACTERIANAS EM CÉLULA EPITELIAL MAMÁRIA OVINA

SARAH VIEIRA PACHECO^{1,2}, DANIELA CAROLINI SAVI³, JHULIE CRISTIANI NOGUEIRA⁴, VANESSA SILVA RETUCI⁵, MAIARA GARCIA BLAGITZ DE AZEVEDO⁶.

1 Introdução

No Brasil vem acontecendo uma ampliação do uso das tecnologias na ovinocultura leiteira para obter melhor qualidade dos produtos (CORRÊA et al. 2014). Contudo, ao se referir a mastite, enfermidade que causa grandes prejuízos, esse estudo busca novas investigações que incluam os aspectos da saúde única, sua incidência e adoção de estratégias mais eficazes para tratamento, controle e prevenção.

Pautada nas informações da literatura sobre células epiteliais mamárias de bovinos (ALMEIDA, OLIVER 2001; PETON et al. 2014), acreditamos que a célula epitelial mamária ovina (CEMO) é imunologicamente ativa. Sua plasticidade funcional permite que seja feita a transferência de imunidade passiva ao neonato via colostro, secretar leite com composição própria e renovar-se ciclicamente durante a lactação, conseqüentemente, levando a adaptar-se aos fatores que podem vir a causar desregulação na fisiologia (PETON et al. 2014). Além disso, consideramos que há uma grande diversidade de microrganismos na glândula mamária ovina influenciando em diferentes nichos.

Estudos semelhantes ainda não foram apresentados. Tais descobertas podem ajudar a compreender e determinar o impacto da microbiota presente e sua atividade funcional na susceptibilidade à mastite, bem como a sua importância para a qualidade do leite e do colostro nesta espécie (GANDA et al., 2016).

1 Acadêmica de graduação, Curso Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza-PR, contato: sarah.pacheco@estudante.uffs.edu.br

2 Grupo de Pesquisa: Sanimal

3 Acadêmica de graduação, Curso Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza-PR

4 Acadêmica de graduação, Curso Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza-PR

5 Doutora, Docente na Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza-PR, Co-orientadora.

6 Doutora, Docente na Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza-PR, Orientadora

2 Objetivos

2.1 Geral

- Caracterizar o perfil de interação patógeno-hospedeiro da CEMO, desafiada *in vitro*, com diferentes bactérias isoladas do leite e ápice do teto de ovelhas leiteiras primíparas e multíparas.

2.2 Específicos

- Caracterizar a interação patógeno - CEMO por meio do desafio bacteriano, *in vitro*, com os principais patógenos isolados dos diferentes nichos;

- Estabelecer uma comparação entre o número de parições e os isolados bacterianos dos diferentes nichos, que determinam uma condição de resistência ou suscetibilidade da mama à infecção;

- Obtenção da CEMO e estabelecimento de modelo de cultivo.

3 Metodologia

3.1 Animais

Para o cultivo celular e a caracterização da interação dos patógenos-CEMO será realizada a biópsia do tecido mamário de duas ovelhas adultas, híginas, com idade entre dois a quatro anos, no início da lactação e sem histórico de mastite. Os animais são oriundos de propriedade comercial da região de São Paulo-SP, sem registros de procedimentos cirúrgicos no período de dois meses pré-experimento.

As avaliações iniciais serão feitas por meio de: hemograma, contagem de ovos por gramas de fezes (OPG), FAMACHA, peso e escore de condição corporal (ECC), exame físico geral, exame da glândula mamária (FEITOSA, 2014) e exame do leite (DELLA LIBERA et al. 2011). Após os animais serão submetidos a anestesia para realização de biópsia.

3.2 Biópsia de glândula mamária ovina

Os cuidados pré e pós operatórios serão realizados pela equipe de pesquisa. Primeiramente será realizado o esgotamento total do leite, marcação da área a ser incisada, tricotomia e assepsia do local. As ovelhas serão contidas fisicamente, mantidas em estação e submetidas ao protocolo anestésico com anestesia local (ponto de incisão) de 2,5 - 4 mL de cloridrato de lidocaína, semelhante ao realizado por Bessani et al. (2022) e sedação leve com

cloridrato de xilazina (0,1 a 0,2 mg/kg/IM) permitindo assim que ele não sinta dor, mantenha-se tranquilo e que permaneça em estação.

Na sequência será removido cirurgicamente um fragmento de aproximadamente 2cm de diâmetro, no ponto médio de cada metade mamária. Esses fragmentos serão colocados em um recipiente contendo 5mL de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®) com 20% de soro fetal bovino (SFB), acondicionados em recipientes estéreis, armazenados em caixas contendo gelo e transportado ao laboratório.

Logo após o procedimento cirúrgico, o local de incisão será suturado com Vicryl 3-0. Na sequência serão realizados a limpeza e o curativo da ferida cirúrgica. As ovelhas serão monitoradas por meio de exame físico diário, duas vezes ao dia, até a cicatrização completa das feridas cirúrgicas e retirada dos pontos, que deve ocorrer de sete a dez dias após.

3.3 Isolamento e cultivo das CEMO

Os fragmentos serão lavados com solução tampão de fosfato (PBS) por três vezes para redução em fragmentos menores. Em seguida os tecidos serão macerados em cell strainer e cultivados em meio contendo 90% de DMEM (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 µg/mL de Gentamicina, 10 µg/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina, 5 g/mL de Fungizone (Gibco®), 5 µg/mL de insulina, e 1 µg/mL de hidrocortisona.

Estas células serão depositadas em placas de 24 poços e incubadas a 37 °C por 24h. Para a monocamada confluenta, a linhagem celular será tratada com tripsina a 0,25% e ressuspendida em DMEM (cat. n°. 42420- 025, Gibco®) (SOUZA et al., 2016). A troca do meio de cultivo será realizada em 48 – 72 h. As células serão caracterizadas por imunohistoquímica de acordo com o realizado por LAHOUASSA et al. (2007) e BONNEFONT et al. (2012). Após serão criopreservadas para posterior desafio bacteriano.

3.4 Preparação do inóculo bacteriano

A preparação do inóculo para o desafio empregará o descrito por Souza et al. (2016). As cepas serão cultivadas em placas de ágar-sangue de ovelha e as colônias frescas de cada bactéria serão cultivadas usando meio contendo DMEM e suplementadas com soro fetal bovino a 10%, insulina 5 µg/mL (cat. N° I3536, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) e 1 µg/mL de hidrocortisona a 37 °C por 24h. Posteriormente, todas as cepas serão diluídas a 1:1.000 em caldo BHI fresco e incubadas até atingirem a fase de crescimento exponencial tardio.

Após o crescimento bacteriano em caldo, os tubos serão centrifugados a $2.500\times g$ por 15 minutos e lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato Dulbecco (DPBS) $1\times$ (cat. Nº 14190185, Gibco®, Paisley, Reino Unido). Em seguida, as bactérias serão ressuspensas no meio DMEM (cat. H0888, Sigma-Aldrich) e os inóculos serão ajustados a 3×10^5 ufc/mL (BONNEFONT et al., 2012) e armazenados a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ até processamento adicional. A contagem bacteriana para o ensaio será determinada utilizando espectrofotometria na absorvância de 600 nm e a suspensão será cultivada em ágar-tripticase de soja em diluições seriadas. As colônias serão contadas para confirmar a dose final do inóculo.

3.5 Desafio bacteriano a CEMO

Os ensaios de aderência e internalização dos patógenos à CEMO serão realizados semelhante ao descrito por Sousa et al. (2016) em bovinos. Em síntese, as monocamadas confluentes de CEMO serão lavadas três vezes com $1\times$ DPBS e 4 mL da suspensão do inóculo (3×10^5 UFC/mL) posteriormente adicionado por poço. Primeiro, o número de bactérias no meio CEMO (sobrenadante) será avaliado em cada tempo de amostragem (0 h, antes da adição da suspensão e 1, 3, 6 e 12h depois) pelo método drop-plate de acordo com Herigstad et al. (2001), em que 10 μL da amostra será colocado em ágar de soja tripticase até que as bactérias estejam diluídas o suficiente para contar com precisão as bactérias viáveis (entre 3 e 30 ufc). A contagem do número de bactérias no meio permitirá estimar o crescimento bacteriano no meio a cada tempo de incubação. O número de bactérias obtidas em cada tempo de incubação será utilizado para corrigir o número de bactérias presentes no cultivo e no cálculo da porcentagem de bactérias aderentes e internalizadas.

4 Resultados e discussão

A pesquisa encontra-se em andamento, e, a partir dos dados espera-se obter informações mais significativas para investigação de bactérias benéficas e patogênicas que interagem com a glândula mamária ovina, o que possibilitará redução do uso de antibióticos, favorecendo saúde dos rebanhos e a melhoria da produtividade.

Para além da busca de novas maneiras de tratamento e prevenção contra a mastite ovina, espera se agregar elementos inovadores à mastologia ovina, admitindo o singular impacto para a espécie e perspectivas futuras aos processos de seleção de animais mais resistentes.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, Raul A.; OLIVER, Stephen P. Interaction of coagulase-negative Staphylococcus species with bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 205-212, nov. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/mpat.2001.0465>.

CORRÊA, G. F.; ROHENKOL, J. E.; OSÓRIO, M. T. M. Agronegócio de Leite de Ovinos. In: SELAIVE, A. B. & OSÓRIO, J. C. S. *Produção de Ovinos no Brasil*. 1a ed, Editora Roca: São Paulo. p. 589-600, 2014

BESSANI, D.T.C.; HORSTMANN, R.; LARSEN, R.; PADILHA, C.G.; RIBEIRO, C.V.D.M.; OLIVEIRA, D.e. de. Combination of palmitic and stearic acids increases the expression of lipogenic genes in mammary gland explants of lactating ewes. *Small Ruminant Research*, [S.L.], v. 208, n. 106634, p. 1-5, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2022.106634>

BONNEFONT, Cécile M. D.; RAINARD, Pascal; CUNHA, Patricia; GILBERT, Florence B.; TOUFEER, Mehdi; AUREL, Marie-Rose; RUPP, Rachel; FOUCRAS, Gilles. Genetic susceptibility to *S. aureus* mastitis in sheep: differential expression of mammary epithelial cells in response to live bacteria or supernatant. *Physiological Genomics*, [S.L.], v. 44, n. 7, p. 403-416, 1 abr. 2012. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00155.2011>

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; M. G. BLAGITZ, F. N.; SOUZA, C. F.; BATISTA, M. R.; AZEDO, L; GOMES, V. Somatic cell and differential leukocytes count in relation to California mastitis test in Santa Inês ewes milk. *Indian Veterinary Journal*. v. 88, n.9, p. 19-21. 2011

FEITOSA, Francisco Leydson Formiga. *Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico*. 3. ed. São Paulo: Roca, 2014. 644 p.

GANDA, Erika K.; BISINOTTO, Rafael S.; LIMA, Svetlana F.; KRONAUER, Kristina; DECTER, Dean H.; OIKONOMOU, Georgios; SCHUKKEN, Ynte H.; BICALHO, Rodrigo C.. Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 37565, 22 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep37565>.

HERIGSTAD, Becky; HAMILTON, Martin; HEERSINK, Joanna. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal Of Microbiological Methods*, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 121-129, mar. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00241-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00241-4).

LAHOUSSA, Hichem; MOUSSAY, Etienne; RAINARD, Pascal; RIOLLET, Céline. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine*, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 12-21, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2007.04.006>.

PETON, Vincent; BOUCHARD, Damien s; ALMEIDA, Sintia; RAULT, Lucie; FALENTIN, Hélène; JARDIN, Julien; JAN, Gwénaél; HERNANDEZ, David; FRANÇOIS, Patrice; SCHRENZEL, Jacques. Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305 a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. *Veterinary Research*, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 45, 14 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13567-014-0106-7>.

SOUZA, F.N.; PIEPERS, S.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; HEINEMANN, M.B.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; VliegHER, S. de. Interaction between bovine-associated coagulase-negative staphylococci species and strains and bovine mammary epithelial cells reflects differences in ecology and epidemiological behavior. *Journal Of Dairy Science*, [S.L.], v. 99, n. 4, p. 2867-2874, abr. 2016. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10230>.

Palavras-chave: Cultivo celular; Interação; Mastite; Tratamento.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2022 - 0286

Financiamento: Fundação Araucária