

**ESTUDO DO PROTEINOGRAMA E DOS MINERAIS COBRE, FERRO E ZINCO
NO SORO EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS COM MASTITE
EXPERIMENTAL POR *Staphylococcus aureus***

Nivaldo de Azevêdo Costa¹, Luis Carlos Valeriano Simão¹, Rogério Adriano dos Santos¹,
José Augusto Bastos Afonso², José Jurandir Fagliari³, Elizabeth da Cruz Cardoso⁴, Pierre
Castro Soares⁵, Carla Lopes de Mendonça²

1.Aluno do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária/UFRPE, Recife, PE, Brasil

2.Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns, UFRPE, C.P. 152, Garanhuns, PE 55292-901.

E-mail: cbg@prppg.ufrpe.br (autor correspondente)

3.Depto de Clínica e Cirurgia, Faculdade de Ciências Agrárias, UNESP, Jaboticabal, SP

4.Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ

5.Depto de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife

PALAVRAS-CHAVE: Bactéria Gram positiva, infecção intramamária, ovinos, proteínas de fase aguda, SDS-PAGE

ABSTRACT

**EVALUATION OF PROTEINOGRAM AND LEVELS OF COPPER, IRON AND
ZINC OF SANTA INÊS EWES WITH EXPERIMENTALLY INDUCED
STAPHYLOCOCCUS AUREUS MASTITIS**

This study evaluates changes in the serum proteinogram and concentrations of copper, iron, and zinc in Santa Inês primiparous ewes with experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. The right mammary gland of 10 animals were inoculated with $1,0 \times 10^4$ UFC/mL. The clinical exam, polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and determination of Cu, Fe, Zn, and plasma fibrinogen (PF) levels were carried out just before inoculation and after 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 168, 180, 288, and 336 hours. All animals presented mastitis and subsequent loss of function of the gland. A total of 23 protein fractions were detected. Their molecular weights (MW) varied between 26,000 and 185,000 daltons (Da), which allowed the identification of positive and negative acute phase proteins, immunoglobulins (IgA and IgG), and some nonidentified proteins. A positive correlation between PF and ceruloplasmin ($r=0,74$), haptoglobin ($r=0,62$) and IgA ($r=0,62$) was also evidenced. Results revealed the importance of ceruloplasmin and haptoglobin as acute phase proteins in intramammary infections of ewes and reiterate fibrinogen as an inflammatory

marker. Serum alterations of Cu, Fe and Zn indicated inflammatory actions of mediators triggered by *S. aureus*.

KEYWORDS: Acute-phase proteins, Gram positive bacteria, intramammary infection, SDS-PAGE, sheep

INTRODUÇÃO

No Brasil, o *Staphylococcus aureus* é relatado como o principal agente da mastite em ovelhas, acarretando transtornos sistêmicos e locais, inclusive com perda do parênquima mamário (OLIVEIRA, 2007). Várias técnicas já estão bem estabelecidas no diagnóstico da mastite, no entanto, a quantificação das PFA pode não apenas detectar a presença de um processo inflamatório em franca ação, mas também indicar um prognóstico e/ou monitorar a resposta do indivíduo à terapia instituída (ECKERSALL, 2000). O aumento na concentração das PFA precede o início do aumento na contagem de células somáticas no leite de vacas com mastite clínica, sendo um importante biomarcador com capacidade de predição (SANDHOLM, 1995). A avaliação do perfil de biomarcadores de reação inflamatória da glândula mamária de ovelhas, bem como de elementos traços, como o Cu, Fe e Zn revestem-se de grande importância, ampliando as possibilidades da utilização de ferramentas diagnóstica e monitoramento frente à utilização de fármacos terapêuticos capazes de restituir a higidez da glândula. Objetivou-se avaliar a patogenicidade do *S. aureus* sobre a glândula mamária de ovelhas, por meio da avaliação da concentração de algumas proteínas, entre as quais as de fase aguda e das dosagens séricas dos minerais cobre, ferro e zinco.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se dez ovelhas Santa Inês, primíparas, recém paridas (> 15 dias pós-parto), dois anos de idade, mantidas em aprisco e dieta constituída de feno de tifton (*Cynodon* sp), capim elefante (*Pennisetum purpureum*), concentrado (aproximadamente 200g/animal/dia), sal mineral e água *ad libitum*. Os borregos foram separados das mães após o parto, depois da ingestão do colostro. As ovelhas foram ordenhadas manualmente duas vezes/dia.

Previamente à inoculação foram estabelecidos os parâmetros clínicos e laboratoriais estabelecendo o momento controle (*baseline*). A glândula direita foi inoculada com $1,0 \times 10^4$ ufc/mL de *S. aureus*, servindo a esquerda como controle. A cepa empregada foi submetida à caracterização bioquímica, molecular e testada frente a diferentes antimicrobianos. Os animais foram acompanhados diariamente. A partir do diagnóstico da

mastite, procedeu-se a colheita do material estabelecendo os momentos: controle, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h, 96h, 108h, 120h, 132h, 168h, 180h, 288h e 336h pós-inoculação (p.i.). Após o surgimento da infecção e diagnóstico bacteriológico positivo, foi instituído o tratamento, às 36h p.i. Os animais foram submetidos ao exame clínico (DIFFAY et al., 2005). A determinação do FP foi realizada segundo JAIN (1986). A concentração da proteína total sérica foi realizada empregando-se *kit* comercial (Labtest). Para a separação das frações protéicas utilizou-se eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). As concentrações protéicas foram determinadas em densitômetro computadorizado. Como referência foi utilizada uma solução marcadora (Sigma) com pesos moleculares 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 daltons (D), além das proteínas purificadas. A determinação das concentrações de Cu, Fe e Zn foram realizadas de acordo com Milles et al. (2001) e leitura em espectrofotômetro de absorção atômica em chama.

Empregou-se análise de variância (Teste F) utilizando-se o procedimento GLM do SAS, com contraste de médias pelo teste de Duncan. Foram efetivadas análises de regressão ajustadas em função dos momentos experimentais e determinação dos coeficientes de correlação para verificar a relação entre pares de variáveis. A significância obtida na regressão foi avaliada por meio do Teste F. Os dados foram analisados por meio do programa computacional *Statistical Analysis System* (SAS, 2000). Foi adotado o nível de significância (p) de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as glândulas inoculadas apresentaram quadro de mastite clínica aguda. Das dez ovelhas, oito desenvolveram a forma gangrenosa, uma evoluiu para a forma crônica, com fibrose do parênquima mamário e outra foi a óbito 48 h p.i.. Após o tratamento, verificou-se em algumas ovelhas o retorno à normalidade dos indicadores clínicos sistêmicos, no entanto houve perda total da funcionalidade da glândula mamária. A SDS-PAGE permitiu o fracionamento de 23 proteínas, cujos pesos moleculares (PM) variaram de 26.000 a 185.000 daltons (D), sendo possível identificar imunoglobulina A (PM=143.000 D), ceruloplasmina (PM=115.000 D); transferrina (PM=85.000 D), hemopexina (PM=79.000 D); albumina (PM=66.000 D), antitripsina α 1 (PM=60.000 D), haptoglobina (PM=45.000 D), glicoproteína ácida α 1 (PM=40.000 D), imunoglobulina G (PM=36.000 D), bem como das outras proteínas não caracterizadas e identificadas pelos respectivos pesos moleculares. Os estágios iniciais da reação inflamatória, desencadeada pelo *S. aureus* foram responsáveis por várias alterações de fase aguda, sendo uma de suas características a ambigüidade de resposta de dois grupos

distintos de proteínas. As PFA positiva, como a haptoglobina, ceruloplasmina, hemopexina, antitripsina e glicoproteína ácida e as PFA negativa, como a transferrina e a albumina. A elevada concentração da haptoglobina já nas primeiras 24 h.p.i., alcançando níveis máximos às 180h.p.i., ou seja, mais de 14 vezes em relação ao encontrado no momento controle, apesar de significativa ($P < 0,05$), foi inferior aos relatados por SALONEN et al. (1996), que verificaram um aumento de mais de 50 vezes em resposta à mastite experimental por *E. coli* em vacas, provavelmente relacionado ao agente etiológico envolvido, tendo em vista ser a *E. coli*, um forte estímulo para a síntese hepática desta PFA, inclusive usada em modelos experimentais (SANDHOLM, 1995). A elevação da ceruloplasmina seis vezes superior ao observado no *baseline* coincidiu com a gravidade do quadro clínico desencadeado 24h.p.i.. A elevação da concentração desta proteína pode ser justificada por sua ação antiinflamatória e biocatalisadora (CHASSAGNE et al., 1998). A diminuição dos níveis séricos de transferrina até 60 h.p.i. a caracterizam como proteína de fase aguda negativa, relacionada com a imunidade inespecífica, considerando que esta seqüestra íons férricos, que poderiam servir de substrato para diferentes agentes patógenos (MURATA et al., 2004). O decréscimo da concentração da hemopexina nas primeiras 24 h.p.i. poderia estar relacionado a um mecanismo de defesa do organismo animal, caracterizado pela particularidade desta glicoproteína de se ligar a fração heme da hemoglobina, indisponibilizando o ferro para patógenos invasores (JAIN, 1993). Os valores médios de albumina diminuídos nos momentos experimentais subsequentes à indução podem ser justificados pelo fato de ocorrer diminuição desta proteína em resposta a processos inflamatórios (JAIN, 1993). A diminuição inicial observada na concentração da antripsina- $\alpha 1$, sugere que esta não seja representativa como marcador inflamatório nas infecções intra-mamárias em ovelhas causadas pelo *S. aureus*, pois não ocorreu elevação desta proteína nos momentos iniciais de observação, não se mostrando eficaz em predizer a severidade e prognóstico da infecção. Das proteínas identificadas, a glicoproteína ácida $\alpha 1$ foi a única que não sofreu alterações ao longo dos momentos de observação, destoando do encontrado na literatura, onde é relatada como PFA empregada para monitorar processos inflamatórios em diferentes espécies animais (FAGLIARI et al., 2003) e considerada por MURATA et al. (2004) importante biomarcador no monitoramento clínico de processos inflamatórios em bovinos. O leve decréscimo na concentração da imunoglobulina G nos primeiros dias após a infecção pode estar relacionado à migração desta para a glândula na tentativa de auxiliar no controle da infecção, assim como a elevação a partir do 5º dpi, resultante da sua síntese em decorrência do estímulo antigênico (TIZARD, 2002). A concentração de IgA no soro demonstrou correlação positiva com o fibrinogênio ($r = 0,63$) e

com a ceruloplasmina ($r=0,65$), ambas PFA positiva. O perfil de hiperfibrinogenemia entre 60 a 180 h.p.i. foi indicativo de um processo inflamatório resultante do aumento de sua síntese pelos hepatócitos (JAIN, 1993), sendo verificada alta correlação do fibrinogênio plasmático e a ceruloplasmina ($r =0,74$) e deste com a haptoglobina ($r=0,62$), ambas reconhecidas como importantes PFA de ruminantes.

Foi observada elevação ($P<0,05$) nos teores séricos do Cu, que alcançou valor máximo às 168hpi (1,29 $\mu\text{g/dL}$). Os valores do Fe elevaram-se discretamente 12 hpi, e a partir de 24hpi decresceram ($P<0,05$) (2,25 $\mu\text{g/dL}$), mantendo-se inferior ao estabelecido antes da infecção até 180 horas p.i.. Foi observada diminuição ($P<0,05$) nos valores do Zn a partir de 24h p.i. ($P<0,05$), com menor valor entre este momento e de 36 horas p.i.. (0.46 $\mu\text{g/dL}$), nos dois últimos momentos (288h e 336h) os teores séricos foram semelhantes aos iniciais. A diminuição expressiva encontrada para os valores do ferro e zinco foi relatada, em maior ou menor intensidade, nos casos de mastite em vacas, cabras e ovelhas, apesar de MIDDLETON et al. (2004) concluírem que o processo de indisponibilização de minerais como um mecanismo de defesa inespecífico na mastite por *S. aureus* ser menos acentuado que o descrito para infecções por Gram-negativas, como a causada pela *Escherichia coli*.

CONCLUSÃO

Neste estudo ficou caracterizada a potente ação local do *S. aureus* sobre a glândula mamária de ovelhas e sua repercussão sistêmica por meio da resposta das PFA, particularmente a ceruloplasmina e a haptoglobina, que apresentaram alta correlação com o fibrinogênio plasmático e das alterações séricas dos minerais caracterizadas pelo decréscimo do Fe e Zn e elevação do Cu.

AGRADECIMENTOS

Ao MCT/CNPq pelo suporte financeiro e à Dra Nilma C. Leal (Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife) pela caracterização molecular da amostra de *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

CHASSAGNE, M.; BARNOUIN, J.; CHACORNAC, J. P. Biological predictors for early clinical mastitis occurrence in Holstein cows under field conditions in France. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 35. p. 29-38, 1998.

DIFFAY, B. C.; MCKENZIE, D.; WOLF, C.; PUGH, D.G . Abordagem e exame de ovinos e caprinos. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos** . São Paulo: Roca, p. 1-19, 2005.

ECKERSALL, P. D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue de Medecine Veterinaire**, Toulouse, v. 151, p. 577-584, 2000.

FAGLIARI J. J.; WEISS D. J.; MCCLENANHAN D. M.; EVANSON O. A. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n.4, p. 383-387, 2003.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993.

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4 ed.; Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 221p.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

MIDDLETON, J. R.; LUBY, C. D.; VIERA, L.; TYLER, J. W.; CASTEEL, S. Short Communication: Influence of *Staphylococcus aureus* Intramammary Infection on Serum Copper, Zinc, and Iron Concentrations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v 87, p. 976-979, 2004.

MILLES, P. N.; WILKINSON, S., MCDOWELL, L. R. **Analysis of mineral for animal nutrition research**. 3.ed. Florida: University of Florida - Department of Animal Sciences/USDA/T-STAR, 2001, 118p.

MURATA H.; SHIMADA N.; YOSHIOKA M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, London, v. 168, p. 28-40, 2004.

OLIVEIRA, L. G. L. **Estudo clínico-epidemiológico e bacteriológico da mastite em ovelhas da raça Santa Inês no agreste meridional do Estado de Pernambuco**. 2007. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SALONEN, M.; HIRVONEN, J.; PIÖRÄLÄ, S.; SANKARI, S.; SANDHOLM, M. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 60, n.1, p. 88-91, 1996.

SANDHOLM, M. Inflammation in mastitis. IN: SANDHOLM, M.; BUZALSKI, T. H.; KAARTINEN, L.; PYORALA S. **The bovine udder and mastitis**. Helsinki: Gummerus Kirjapaino, 1995. p. 59-75.

SAS INSTITUT. **SAS User's Guide**: statistical Analysis Systems Institute. Inc. Cary, 2000.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**: uma introdução. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. 532p.